

616.0795
Rik
p 21

**PENGARUH EKSTRAK BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)
TERHADAP RESPON IMUN SELULER MENCIT BALB/C
YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

(The Effects of Garlic Extract (*Allium sativum*) on the Cellular Immune
Response of Balb/C Mice Infected with *Salmonella Typhimurium*)



T E S I S

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedik

Yosef Purwoko
G4A098011

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
S E M A R A N G
Desember
2003**

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)
TERHADAP RESPON IMUN SELULER MENCIT BALB/C
YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

disusun oleh


Yosef Purwoko
G4A098011

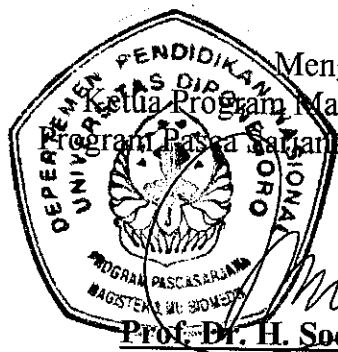
Telah diajukan dan dipertahankan dalam ujian Tesis
pada tanggal 30 Desember 2003

Pembimbing utama



Dr. Edi Dharmana, MSc., PhD.
NIP. 130 529 451

Pembimbing anggota


Dr. Kis Djamiatun, M.Sc.
NIP. 131 916 041



Mengetahui
Ketua Program Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas diponegoro


Prof. Dr. H. Soebowo, Sp.PA(K)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Desember 2003

Yosef Purwoko
G4A098011

RIWAYAT HIDUP

N a m a : Dr. Yosef Purwoko
Tempat/tanggal lahir : Salatiga / 30 Desember 1966
Jenis kelamin : Laki-laki
Pekerjaan : Staf Pengajar Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang
Gol / Pangkat / NIP : III-B / Penata Muda Tk-I / 132 163 895

RIWAYAT PENDIDIKAN

- | | |
|---|-----------|
| 1. SD-N Wonodri Baru Semarang | 1972-1979 |
| 2. SMP-K St. Yoris Semarang | 1979-1982 |
| 3. SMA-N 3 Semarang | 1982-1985 |
| 4. FK UNDIP (Program Pendidikan Sarjana) Semarang | 1985-1990 |
| 5. FK UNDIP (Program Pendidikan Profesi) Semarang | 1990-1993 |
| 6. Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP | 1998-2003 |

RIWAYAT PEKERJAAN

- | | |
|---|---------------|
| 1. Dokter PTT Puskesmas Bandarharjo Semarang | 1994-1997 |
| 2. Staf pengajar Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang | 1997-sekarang |

KATA PENGANTAR

Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena dengan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Pimpinan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan segenap staf pengajar khususnya di Bagian Ilmu Faal FK UNDIP yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan pascasarjana dan senantiasa mendukung serta memberi semangat untuk maju
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk meningkatkan ilmu pengetahuan
3. Prof. Dr. H. Soebowo, Sp.PA(K) sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pascasarjana Universitas Diponegoro beserta seluruh staf yang telah mengajarkan keilmuannya
4. Dr. Edi Dharmana, M.Sc, Ph.D selaku pembimbing utama dan Dr. Kis Djamiatun, M.Sc selaku pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga dan arahnya dalam penyelesaian tesis ini
5. Para nara sumber dan tim penguji yang telah berkenan memberikan petunjuk, saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian hingga penulisan tesis untuk mencapai hasil yang baik

6. Pimpinan dan staf laboratorium Bioteknologi FK UNDIP, pimpinan dan staf laboratorium GAKI FK UNDIP, Ketua bagian Biokimia FK UNDIP beserta staf dan Kepala Balai Laboratorium Kesehatan Semarang beserta staf unit mikrobiologi yang telah membantu pelaksanaan teknis laboratoris dan diberi kesempatan memanfaatkan fasilitas laboratorium untuk penelitian tesis
7. Istriku Suzanna, anak-anakku Andrey dan Caroline tercinta yang telah mendukung dengan doa dan pendampingannya selama menempuh pendidikan
8. Semua pihak yang tidak dapat ditulis satu persatu yang telah memberikan dukungan moril dan bantuannya selama pendidikan hingga selesainya penulisan tesis ini

Akhir kata dengan kerendahan hati penulis mohon ktitik membangun demi sempurnanya penulisan tesis ini dan semoga dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Semarang, Desember 2003

Penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Pernyataan	iii
Riwayat Hidup	iv
Kata Pengantar	v
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	ix
Daftar Gambar	x
Daftar Lampiran	xii
Abstrak	xiii
<i>Abstract</i>	xiv
 BAB I. PENDAHULUAN	 1
I.A. Latar Belakang	1
I.B. Perumusan Masalah	4
I.C. Tujuan Penelitian	5
I.C.1. Tujuan Umum	5
I.C.2. Tujuan Khusus	5
I.D. Manfaat Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
II.A. Sistem Imunitas	7
II.B. Proses Imunitas tubuh	8
II.C. Salmonella Typhimurium	14
II.D. Imunitas Terhadap Salmonella Typhimurium	15
II.E. Bawang Putih	17
II.F. Pengaruh Bawang Putih Terhadap Imunitas	22

II.G. Pengaruh Infeksi Salmonella terhadap Produksi Nitrit Oksida (NO)	23
BAB III. KONSEP DAN HIPOTESIS	26
III. A. Kerangka Teori	26
III. B. Kerangka Konsep	27
III. C. Hipotesis	28
BAB IV. METODE PENELITIAN	28
IV.A. Rancangan Penelitian	28
IV.B. Populasi dan Sampel	31
IV.C. Variabel Penelitian	31
IV.D. Bahan	32
IV.E. Alat/ Instrumen Penelitian	33
IV.F. Tempat dan Waktu Penelitian	34
IV.G. Prosedur Pengumpulan Data	34
IV.H. Alur Kerja	37
IV.I. Pemeriksaan-Prosedur Pengambilan Sampel	38
IV.I.1. Pemeriksaan Hitung Kuman Hepar dan Lien	39
IV.I.2. Pemeriksaan Ikatan Limfosit-T dengan Makrofag	40
IV.I.3. Pemeriksaan Produksi NO	42
IV.I.4. Pengamatan Survival	44
IV.J. ANALISA DATA	44
BAB V. HASIL PENELITIAN	45
BAB VI. PEMBAHASAN	55
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	64
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Hasil penghitungan koloni kuman dam cfu/gram hepar	46
Tabel 2. Hasil penghitungan koloni kuman dam cfu/gram lien	47
Tabel 3. Jumlah Ikatan limfosit T dengan makrofag	49
Tabel 4. Kadar NO	51
Tabel 5. Analisis survival mencit	52

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1.	
Kaskade aktifitas sitokin sebagai zat <i>pyrogen endogenous</i>	16
Gambar 2.	
Diagram dot-plot koloni kuman/gram hepar	45
Gambar 3.	
Diagram dot-plot koloni kuman/gram lien	47
Gambar 4.	
Diagram dot-plot jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag	49
Gambar 5.	
Diagram dot-plot kadar NO makrofag	51
Gambar 6.	
Diagram survival Kaplan-Meier mencit	53
Gambar 7.	
Diagram batang rerata waktu survival	54
Gambar 8.	
Kandang individual mencit	71
Gambar 9.	
Sediaan ekstrak bawang putih, <i>S. typhimurium</i> dalam medium transport dan ampul sediaan larutan ekstrak bawang putih	71
Gambar 10.	
Timbangan digital	72
Gambar 11.	
Pengambilan cairan peritoneum	72
Gambar 12.	
Cairan peritoneum	73
Gambar 13.	
Koloni <i>Salmonella typhimurium</i> dalam medium <i>Salmonella-Shigella</i> agar ...	73

Gambar 14.	
Sebuah limfosit yang berikatan dengan makrofag	74
Gambar 15.	
Dua buah limfosit yang berikatan dengan makrofag	74
Gambar 16.	
Tiga buah limfosit yang berikatan dengan makrofag	75
Gambar 17.	
Empat buah limfosit yang berikatan dengan makrofag	75

DAFTAR LAMPIRAN

halaman

Lampiran 1.

Foto bahan dan hasil penelitian yang digunakan 71

Lampiran 2.

Hasil analisis statistik 76

Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum*) Terhadap Respon Imun Seluler Mencit Balb/C yang Diinfeksi *Salmonella Typhimurium*

Yosef Purwoko

ABSTRAK

Latar Belakang : Penyakit demam tifoid masih tersebar luas di negara-negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh *S. typhi* yang merupakan kuman bentuk batang gram negatif dan hidup intraseluler sehingga respon imun seluler berperan utama dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi kuman ini. Bawang putih memiliki komponen aktif utama yaitu *alliin* yang mempunyai efek imunomodulator. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh bawang putih terhadap respon imun seluler *mencit Balb/C* terhadap infeksi *S. Typhimurium*.

Metoda : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *the post test-only control group design*. Hewan coba yaitu 24 mencit jantan Balb/C secara acak dibagi menjadi 4 kelompok ($n=6$ perkelompok): kelompok kontrol, dan 3 kelompok perlakuan (P) ekstrak bawang putih 1, 2 dan 4 mg per 1 ml pelarut setiap hari selama 10 hari. Pada hari ke-8 semua mencit diinfeksi *S. Typhimurium* (phage 510; 10^7). Pemeriksaan respon imun seluler dilakukan pada hari ke-11, dengan menilai hitung jumlah koloni kuman hepar dan lien, jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag dan pengukuran kadar produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag. Pengamatan *survival rate* dilakukan pada 4 kelompok mencit ($n=12$ perkelompok) dengan perlakuan seperti diatas, diamati hingga 14 hari setelah infeksi. Analisa data dengan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Uji survival dengan *Kaplan-Meier* dilanjutkan uji *Log-rank* dengan taraf signifikansi $p<0,05$.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah koloni kuman hepar ($p=0,13$) dan lien ($p=0,13$) pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol namun perbedaannya tidak bermakna. Pada perbandingan antar kelompok, didapatkan cfu/gram organ hepar K vs P1=0,18, K vs P2=0,03, K vs P3=0,09 dan cfu/gram organ lien K vs P1=0,05, K vs P2=0,33, K vs P3=0,07.

Jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol ($p=0,01$), K vs P1 $p=0,03$, K vs P2 $p<0,001$, K vs P3 $p=0,03$. Kadar NO kelompok perlakuan lebih rendah dibanding kontrol namun perbedaan tidak bermakna ($p=0,37$), K vs P1 $p=0,25$, K vs P2 $p=0,18$, dan K vs P3 $p=0,13$. Analisis survival didapatkan perbedaan bermakna pada K vs P1 $p<0,001$, K vs P2 $p<0,001$, K vs P3 $p<0,001$, P1 vs P2 $p<0,001$ dan P2 vs P3 $p<0,001$, perbedaan tidak bermakna didapatkan pada P1 vs P3 $p=0,20$.

Kesimpulan : Pemberian ekstrak bawang putih pada mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* dapat menurunkan jumlah koloni kuman pada hepar dan lien, peningkatan jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag, produksi NO makrofag lebih rendah tidak bermakna dan peningkatan *survival rate* secara bermakna.

Kata kunci: ekstrak bawang putih, *S. typhimurium*, hitung koloni kuman/cfu, ikatan limfosit T dengan makrofag, NO, *survival rate*

The Effects of Garlic Extract (*Allium sativum*) on the Cellular Immune Response of Balb/C Mice Infected with *Salmonella Typhimurium*

Yosef Purwoko

ABSTRACT

Background: Typhoid fever is still spread largely in developing country such as Indonesia. This illness is caused by *S. typhi*, an intracellular bacteria. It is cellular immune which play the role in bacteria killing. Garlic is one of herbal medicine traditionally used to treat various diseases which is contains alliin with immunomodulatory effect. The aim of this study was to prove garlic extracts administration to cellular immune response of Balb/C mice infected with *S. typhimurium*.

Method: This study was experimental study, with The Post Test-Only Control Group Design. Twenty four Balb/C male mice as the probation objects which randomly divided into 4 groups (6 mice each group): control group (K) and the 3 groups (P) was given garlic extract 1, 2 and 4 mg per ml solution each day for 10 days. All groups were infected with *S. typhimurium* (phage 510; 10^7) at 8th days and samples were executed on day 11th for laboratory test: bacterial colony forming unit of the liver and spleen, T-lymphocyte to macrophage binding, measurement of macrophage's Nitric Oxide (NO) production The survival study consist of 48 Balb/C male mice randomly divided into 4 groups (12 mice each group) which be intervanted like above, will be followed till 14 days after infected with *S. typhimurium*. Collected data will be analyzed along with Kruskal Wallis test followed Mann Whitney test. The survival rate will be analyze with Kaplan Meier test followed by Log-rank for. significant level was accepted when $p < 0.05$.

Result: The results revealed the average liver ($p=0.13$) and spleen ($p=0.13$) bacterial colony forming unit in group P were lower than group K, but there were no significant. Comparison test between liver colony forming unit groups showed as follows K vs. P1= 0.18 , K vs. P2= 0.03 , K vs. P3= 0.09 and for spleen colony forming unit showed as follows K vs. P1= 0.05 , K vs. P2= 0.33 , K vs. P3= 0.07

The result T-lymphocyte and macrophage binding were increased significantly in the treated mice ($p=0.01$). Comparison test to T-lymphocyte and macrophage binding in group were K vs. P1 $p=0.03$, K vs. P2 $p<0.001$, K vs. P3 $p=0.03$.

Measurement of NO production showed no significant lower than K ($p=0.37$). Comparison test to Nitric Oxide production were K vs. P1 $p=0.25$, K vs. P2 $p=0.18$, K vs. P3 $p=0.13$.

Survival analyze showed significant difference compared K vs. P1 $p<0.001$, K vs. P2 $p<0.001$, K vs. P3 $p<0.001$, P1 vs. P2 $p<0.001$, and P2 vs. P3 $p<0.001$, there is no significant different between P1 vs. P3 $p=0.20$

Conclusion: The effect of Garlic extracts to Balb/C mice which infected with *S. typhimurium* was able to reduce liver and spleen bacterial colony forming unit, stimulates higher T lymphocyte-macrophage binding significantly compared to untreated mice, but cannot increases significantly the NOproduction by macrophage although increases survival rate significantly

Key words: Garlic extracts, *S. typhimurium*, bacterial colony forming unit/cfu, T-lymphocyte and macrophage binding, NO, survival rate

BAB I

PENDAHULUAN

I.A. LATAR BELAKANG

Indonesia adalah negara tropis dengan derajat kesehatan yang masih terus ditingkatkan. Infeksi tropis merupakan masalah yang banyak diteliti yang bertujuan untuk meningkatkan derajat kesehatan masyarakat. Salah satu infeksi bakterial yang sering berjangkit di daerah tropik adalah infeksi *Salmonella*. Demam typhoid adalah infeksi sistemik yang disebabkan oleh *S. typhi* atau *S. paratyphi*. Infeksi ini ditularkan secara *oro-fecal* dan sering menimbulkan komplikasi lanjut dan tidak sedikit menyebabkan kematian. Perkiraan di dunia terdapat 16 juta kasus typhoid dengan sekitar 600 ribu kematian, sedangkan Indonesia menempati urutan tertinggi di Asia Tenggara dengan insiden 1.000 per 100 ribu penduduk.¹

Patogenesis infeksi *Salmonella* sangat penting diketahui, dimulai dengan masuknya *Salmonella* melalui sistem pencernaan dan berkembang hingga menimbulkan proses penyakit dan komplikasinya. Peritonitis adalah suatu keadaan inflamasi pada peritonium yang sering terjadi sebagai komplikasi penyakit typhoid, bahkan hingga menimbulkan sepsis. Proses inflamasi sebenarnya merupakan upaya tubuh untuk mengeliminasi dan eradikasi antigen penyebab dan merupakan respon imunologik terhadap berbagai macam infeksi.¹

Dari aspek mikrobiologik, *S. typhi* dan/atau *S. paratyphi* merupakan kuman intraseluler fakultatif Gram negatif yang mempunyai struktur kuman bersifat antigenik terhadap tubuh host. Dinding luar bakteri ini mempunyai komponen antigenik utama berupa lipopolisakarida (LPS), yang berperan sebagai endotoksin.² Endotoksin akan memicu respon imun yang nantinya manifes sebagai peradangan yang melibatkan berbagai sel-sel sistem imun. Sel-sel sistem imun yang berhasil mencapai tempat peradangan akan menjalankan fungsinya sebagai fagosit profesional misalnya makrofag. Sel-sel sistem kekebalan akan teraktifasi dan akan memproduksi mediator-mediator inflamasi termasuk berbagai macam sitokin.²

Penyakit infeksi di Indonesia masih merupakan penyakit yang menonjol, sehingga untuk mengatasinya, antibiotika berperan sangat penting walaupun bukan merupakan satu-satunya obat untuk menyembuhkan penyakit infeksi, karena faktor lain seperti status kekebalan inang juga memegang peran penting disamping jumlah dan virulensi kuman.³

Imunitas seluler mempunyai peranan dalam pertahanan melawan penyakit infeksi, terutama yang disebabkan oleh bakteri patogen intra seluler, jamur, virus dan protozoa.^{3, 4} Respons imun seluler (*cell mediated immunity*) pertama kali dilaporkan oleh George Mackaness (1950) sebagai kekebalan terhadap bakteri intraseluler. Bakteri intraseluler menstimulasi makrofag mensekresikan *Interleukin-12* (IL-12) yang mengaktifkan sel *Natural Killer* (NK) dan juga menstimulasi perkembangan sel T CD₄⁺ khususnya sel Th₁ dan mengaktifkan sel T CD₈⁺. Ketiga jenis sel yang teraktifkan tersebut mensekresikan *interferon*

gamma (IFN- γ) yang akan mengaktifkan makrofag sehingga makrofag tersebut dapat membunuh bakteri intraseluler.⁴

Makrofag adalah sel fagosit profesional, termasuk sistem imun non spesifik dan merupakan sel efektor penting, yang dapat membunuh sel tumor dan infeksi patogen intraseluler. Makrofag berperan pula sebagai sel penyaji antigen serta mensekresi beberapa sitokin yang mengatur elemen imunitas humoral dan seluler.⁴

Dalam berbagai eksperimen, infeksi menggunakan *S. typhimurium* telah banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler yang mempunyai gejala dan tanda mirip dengan demam typhoid pada manusia. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam sel dan dapat menghindari mekanisme bakterisid makrofag. Di lain pihak pada makrofag diharapkan perannya sebagai pertahanan utama terhadap organisme ini. Hal ini mendorong digunakannya imunoterapi yang dapat meningkatkan aktivitas sistem kekebalan.⁵

Imunoterapi dapat dilakukan dengan memberikan obat tradisional misalnya bawang putih. Pada penelitian terdahulu, senyawa ekstrak bawang putih dilaporkan mempunyai efek meningkatkan respon imun primer awal pada tikus putih dan diperkirakan akan memberikan efek yang menguntungkan terhadap rangkaian imunitas seluler dengan meningkatkan *bacterial killing*, karena mempunyai sifat imunomodulator.^{5,6}

Shyh-ming dkk. mendapatkan efek aditif dan sinergistik dari bawang putih terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *K. pneumoniae* yang resisten terhadap

antibiotik generasi baru, dan bahkan mencegah infeksi nosokomial yang ditimbulkannya.⁷

Pertumbuhan kuman *S. typhimurium* sangat dipengaruhi oleh kemampuannya untuk bertahan dan tumbuh di dalam makrofag inang. In-vivo, kuman ini mampu masuk sel-sel inang selain makrofag, seperti halnya hepatosit maupun splenosit yang merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan bakteri ini.⁴

Pada penelitian ini, akan disajikan hasil penelitian respon imunitas seluler yang diukur meliputi hitung kuman organ hepar dan lien, ikatan limfosit-T terhadap makrofag, kemampuan makrofag untuk memproduksi NO dan serta perjalanan proses penyakit diamati dengan *survival study*.

I.B. PERUMUSAN MASALAH

Apakah pemberian ekstrak bawang putih dapat meningkatkan respon imunitas seluler berupa penurunan jumlah kuman dalam hepar dan lien, peningkatan ikatan limfosit T dengan makrofag, peningkatan produksi NO makrofag dan sehingga persentase kumulatif *survival rate* mencit meningkat?

I.C. TUJUAN PENELITIAN

I.C.1. TUJUAN UMUM

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *S. typhimurium*.

I.C.2. TUJUAN KHUSUS

1. Menganalisa adanya perbedaan hasil hitung kuman organ hepar dan lien pada mencit dengan pemberian ekstrak bawang putih dibandingkan dengan kontrol.
2. Menganalisa adanya perbedaan jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag dari mencit dengan pemberian ekstrak bawang putih dibandingkan dengan kontrol
3. Menganalisa adanya perbedaan produksi NO makrofag dari mencit dengan pemberian ekstrak bawang putih dibandingkan dengan kontrol.
4. Membuktikan peningkatan persentase kumulatif *survival* mencit yang diberi ekstrak bawang putih dibandingkan dengan kontrol.

I.D. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi dalam penggunaan ekstrak bawang putih yang berkaitan dengan terapi penyakit khususnya penyakit infeksi. Walaupun penelitian ini dilakukan pada hewan coba namun hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.A. SISTEM IMUNITAS

Imunitas berasal dari bahasa latin *Immunis* yang dihubungkan dengan kebebasan warga negara dari berbagai macam kewajiban membayar pajak kepada penguasa. Imunitas diartikan sebagai perlindungan terhadap kondisi patologik misalnya infeksi. Imunitas adalah suatu mekanisme fisiologis berupa kemampuan mengenal suatu zat asing dan selanjutnya tubuh akan mengadakan usaha menenyapkan antigen tersebut. Sistem imunitas merupakan kumpulan sel-sel yang bertanggung jawab terhadap bentuk zat asing (*non-self*) atau zat dari tubuh sendiri (*self*) dan bersama-sama berkoordinasi membentuk respon imun.^{8, 9, 10}

Sistem imun dibedakan menjadi 2 macam, yaitu *Innate immunity* yang umumnya merupakan imunitas bawaan misalnya melalui proses fagositosis, reaksi inflamasi, dll. Yang berikutnya berupa *Adaptive immune system (Adoptive immune system)*, merupakan respon terhadap adanya antigen tertentu dan merupakan interaksi berbagai komponen dalam sistem imun. Respon *adaptive immune* berupa respon imun seluler yang terdiri dari komponen seluler, respon imun humoral yang menghasilkan antibodi terhadap konfigurasi asing tersebut, dan interaksi antara respon imun seluler dan humoral.^{8, 9, 10} Proses imunitas tubuh

dicapai melalui tahap pengenalan terhadap konfigurasi asing yang masuk ke dalam tubuh, aktivasi mobilitas komponen imunitas, dan pelaksanaan efektor.^{8,9}

Protein, lemak, karbohidrat atau asam lemak merupakan imunogen yang poten dan sering menjadi target respon imun karena berikatan dengan protein yang imunogenik (seperti lipoprotein, glikoprotein atau kompleks nukleoprotein). Sebagai contoh sebuah bakteri, terdiri dari bermacam-macam protein dan molekul berlainan yang akan memacu respon imun spesifik.¹¹

II.B. PROSES IMUNITAS TUBUH

II.B.1. LANGKAH PENGENALAN.

Limfosit-B dapat mengenali antigen tanpa bantuan sel lain, akan tetapi limfosit-T akan menanggapi antigen apabila disajikan oleh sel pelengkap antara lain adalah sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cell=APC*) yaitu makrofag, sel dendritik (*Dendritic Cell*) yang terdapat dalam jaringan limfoid, limfosit-B, sel Langerhans dikulit dan lain-lain.^{8,9,12}

Sel-T hanya akan mengenali imunogen yang terikat misal bakteri pada protein *Major Histocompatibility Complex* (MHC) yang terdapat pada permukaan sel-sel penyaji. Ada dua kelas yang berbeda untuk protein MHC, yang masing-masing akan dikenali oleh 2 subset limfosit-T. MHC kelas I akan diekspresikan oleh seluruh sel-sel tubuh yang berinti dan digunakan untuk menyajikan substansi-substansi ke sel-T CD_8^+ yang bersifat sitotoksik.¹²

MHC kelas II hanya diekspresikan oleh makrofag dan beberapa tipe sel lain dan mempresentasikan antigen kepada sel-T CD_4^+ , yang berfungsi sebagai sel T_h . Karena aktivasi sel T_h dibutuhkan untuk keseluruhan respon imun, maka APC yang memiliki MHC Kelas II merupakan poros dalam pengaturan respon ini. Untuk selanjutnya istilah APC biasanya dipakai untuk menyatakan sel-sel khusus yang memiliki protein MHC II. ^{9, 10, 12}

Secara umum antigen eksogen dapat ditangkap melalui bermacam-macam cara. Makrofag adalah salah satu sel APC yang memiliki kemampuan fagosit sehingga selalu siap menangkap bagian-bagian imunogen. Sel-sel APC lain memiliki kemampuan fagosit kecil dan cenderung melakukan endositosis dengan perantara reseptor atau pinositosis. Suatu cara yang juga dilakukan sangat efektif oleh makrofag. ¹³

Pada infeksi *Salmonella*, sekali bakteri ini mencapai usus halus, maka akan tahan terhadap faktor imunitas alami yang ada di situ sebelum terjadi penetrasi ke mukosa. *Salmonella* akan masuk melalui lapisan sel M pada *plaques Peyer* atau juga sel non fagosit melalui proses endositosis ke endosom. ¹⁹ Proses proteolitik protein asing tersebut terjadi pada lingkungan asam endosom atau lisosom sehingga terbentuk fragmen-fragmen peptida asing yang dipresentasikan pada sel-T CD_4^+ bersama MHC II. ¹²

II.B.2. LANGKAH AKTIFASI^{8,9}

Untuk memulai langkah aktivasi, pada infeksi *Salmonella* ini dibutuhkan ikatan antigen dengan reseptor antigen dan aktivasi sel-T oleh molekul-molekul kostimulator. Salah satu yang terpenting dan merupakan jalur khusus untuk aktivasi sel T yaitu keterlibatan molekul permukaan CD₂₈ yang akan berikatan dengan molekul kostimulator B7-1 (CD₈₀) dan B7-2 (CD₈₆) yang diekspresikan oleh sel APC. CD₂₈ mengirimkan sinyal yang meningkatkan respon sel-T terhadap antigen. Aktivasi sel T memungkinkan terjadinya respon untuk menghadapi antigen asing tersebut dengan cara mengeluarkan sitokin untuk menghancurkan sel sasaran (*Target Cell*).

Proliferasi limfosit-T akibat pengenalan antigen terutama bekerja melalui jalan pertumbuhan autokrin (*Autocrine Growth Pathway*). Limfosit-T mengeluarkan sitokin peningkat pertumbuhan antara lain adalah IL-2 dan IL-4. Respon proliferasi ini berupa pembiakan klon dari limfosit-T yang spesifik bagi antigen tertentu, dan beberapa berkembang menjadi sel-T memori.

II.B.3. LANGKAH PELAKSANAAN EFEKTOR

Menyusul langkah-langkah tersebut di atas maka mulailah langkah pelaksanaan efektor yang terpacu dari sistem imunitas alamiah dan imunitas spesifik yang meliputi produksi sitokin oleh limfosit-T dan beberapa sel-sel non limfoid yang merupakan "*soluble mediator*" pada imunitas non spesifik dan imunitas spesifik, kehadiran sel-sel efektor dari imunitas seluler termasuk

limfosit-T, makrofag dan sel NK yang ikut serta dalam reaksi inflamasi karena dan fungsinya sebagai pertahanan pertama terhadap mikroba intraseluler, bekerjanya sistem komplemen, dan reaksi khusus yang berhubungan dengan imunitas humoral. *S.typhimurium* merupakan bakteri intraseluler dapat hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit. Antibodi dalam plasma tidak bisa berperan untuk mengeliminasi bakteri tersebut sehingga yang berperan adalah imunitas seluler.⁴ Imunitas seluler terhadap infeksi *S. typhimurium* sering dipakai sebagai model untuk menunjukkan respons imun terhadap bakteri intraseluler. Imunitas seluler dapat membunuh bakteri intraseluler dengan 2 cara yaitu: 1. Sitokin yang dihasilkan oleh limfosit T terutama INF- γ mengaktifkan makrofag sehingga makrofag yang aktif tersebut dapat membunuh bakteri intraseluler. 2. Limfosit T sitotoksik dapat merusak membran sel yang terinfeksi bakteri intraseluler sehingga bakteri tersebut dapat berikatan dengan antibodi dalam plasma. Kompleks antigen-antibodi tersebut mengaktifkan komplemen sehingga dapat membunuh bakteri tersebut.⁴

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri dimulai dengan proses fagositosis yang kemudian diikuti dengan pembunuhan kuman (*bacterial killing*). Ada beberapa bakteri intraseluler yang dapat luput dari pencernaan tersebut, karena hanya makrofag yang teraktifkan yang dapat membunuh bakteri intraseluler.⁴

Bakteri intraseluler menstimulasi produksi IL-12 yang mengaktifkan sel NK, menstimulasi perkembangan sel T_H1 dan mengaktifkan sel T CD₈⁺. Ke tiga

jenis sel yang teraktifkan tersebut mensekresikan IFN- γ yang mengaktifkan makrofag sehingga makrofag tersebut dapat membunuh bakteri intraseluler.⁴

Selain itu, IFN- γ juga meningkatkan kemampuan endositosis dan fagositosis monosit.

Makrofag teraktivasi selain mampu membunuh mikroorganisme melalui mekanisme fagositosis, juga mampu membentuk ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*) dan NO. Setelah menelan bakteri, makrofag akan membunuh bakteri dengan membangkitkan oksigen aktif tersebut.⁴

Kemampuan makrofag membunuh bakteri tergantung pada senyawa *oxygen dependent* (*hydrogen peroxide, singlet oxygen, hydroxy radicals*) dan senyawa *oxygen independent* (*lisosome, lactoferin, cationic protein*).⁹ Makrofag juga bertanggung jawab terhadap produksi NO, dimana sintesa NO dari makrofag yang teraktivasi berkaitan dengan efek sitotoksiknya seperti pada proses pembunuhan intraseluler.⁹

II.B.4. FUNGSI LIMFOSIT-T DALAM FUNGSI PENGHASIL SITOKIN

Sel-T CD₄⁺ yang telah teraktifasi akan berdiferensiasi, tergantung tipe stimulan utamanya, sitokin akan dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th₁ pada fase efektor adalah IFN- γ . IFN- γ akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagositosis. Fungsi pokok Th₁ adalah sebagai pertahanan terhadap infeksi di mana proses fagositosis sangat diperlukan.

Th₁ juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel-T CD₈⁺. Th₁ berfungsi sebagai pembantu pertumbuhan Limfosit-T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel. Sel-sel Th₁ memproduksi LT yang meningkatkan aktivasi netrofil.

Sitokin yang dihasilkan Th₂ adalah IL-4 dan IL-5. Th₂ berfungsi sebagai mediator untuk reaksi alergi dan pertahanan infeksi terhadap cacing dan arthropoda. Th₂ juga memproduksi sitokin seperti IL-13 dan IL-10 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag. Jadi Th₂ kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th₁. Pertumbuhan yang berlebihan dan tak terkontrol dari Th₂ berhubungan dengan berkurangnya imunitas seluler terhadap infeksi mikroba intraseluler seperti mikobakteria.

Diferensiasi Sel-T CD₄⁺ menjadi Th₁ dan Th₂ tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas. Beberapa bakteri intaseluler seperti *Listeria*, *Mikobakteria*, *Salmonella* dan beberapa parasit seperti *Leishmania* menginfeksi makrofag yang memacu untuk memberikan respon dengan mengeluarkan IL-12. Mikroba lain mungkin memacu produksi IL-12 secara tidak langsung. Misalnya virus dan beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi IFN- γ yang memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 berikatan dengan Sel-T CD₄⁺ sehingga memacu untuk menjadi sel Th₁. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN- γ dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel-T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas

seluler. IFN- γ yang diproduksi Th₁ akan menghambat proliferasi sel Th₂ sehingga meningkatkan dominasi sel Th₁.¹⁴

Diferensiasi sel-T CD₄⁺ menjadi Th₂ dipacu oleh IL-4. Sel-T CD₄⁺ mengeluarkan IL-4 dalam jumlah kecil pada saat aktivasi awal. Apabila antigen bersifat persisten dan berada dalam konsentrasi tinggi maka konsentrasi lokal IL-4 akan meningkat. Jika antigen tidak memicu inflamasi dengan mengeluarkan IL-12 maka hasilnya adalah peningkatan diferensiasi sel-T ke subset Th₂. Respon terhadap parasit dan alergen lingkungan yang menyebabkan pergeseran ke Th₂ karena stimulasi sel-T yang persisten dan berulang-ulang dengan inflamasi yang minimal.^{8,9}

II.C. SALMONELLA TYPHIMURIUM

S. typhimurium merupakan bakteri fakultatif intraseluler yang pertama kali diperkenalkan oleh Suter yang digambarkan dapat hidup dan berproliferasi di dalam sel fagosit maupun diluar sel.¹⁵ Pada manusia, infeksi *Salmonella* disebut dengan salmonellosis, yang ditandai dengan demam sehingga lebih dikenal dengan demam typhoid. Angka kesakitan dan kematian yang disebabkan oleh *Salmonella* di berbagai negara masih tinggi, terlebih di Indonesia. Demam typhoid disebabkan oleh *S. typhi* dan/atau *S. paratyphi A & B*. *S. typhi* maupun *S. paratyphi A & B* merupakan bakteri yang mengandung lipopolisakarida (LPS, endotoksin).^{2, 8} Virulensi dari bakteri disebabkan oleh komponen yang dikenal sebagai lipid A

akan merangsang sistem imun inang untuk menghasilkan mediator-mediator *proinflammatory* dan/atau respon iNOs.^{2,8}

II.D. IMUNITAS TERHADAP SALMONELLA TYPHIMURIUM

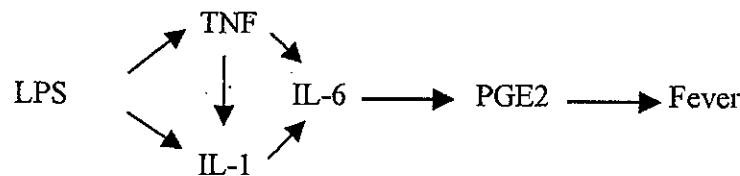
Konsep tentang imunitas pertama kali diperkenalkan oleh Metchnikoff (1907) yang diartikan sebagai kemampuan alami dari sel-sel fagosit inang untuk memakan dan mematikan kuman-kuman yang masuk.¹⁶ Aktivitas sel-sel fagosit (sel polimorfonuklear dan makrofag) yang pertama menghadapi kuman yang menginfeksi tubuh disebut sebagai imunitas seluler. Imunitas seluler yang teraktifasi akan meningkatkan kemampuan sel-sel fagosit terhadap bakteri dengan dibantu oleh imunitas humoral melalui proses opsonisasi.^{9,17}

Hal serupa juga terjadi apabila *S. typhi* menginfeksi tubuh, maka akan terjadi respon imun oleh tubuh. Patogenesis demam typhoid diawali dengan masuknya bakteri ke dalam saluran cerna melalui makanan atau minuman yang tercemar oleh bakteri *Salmonella*. Saat infeksi *Salmonella* terjadi, bakteri akan melewati sistem imun alamiah berupa asam lambung, garam empedu, lisosim, komplemen dan peptida-peptida kation antimikroba.¹⁰ Secara epidemiologik, untuk terjadinya infeksi tergantung pada jumlah kuman, virulensi kuman dan daya tahan inang yang diatur oleh sistem imun berupa kemampuan memobilisasi mekanisme pertahanan.^{10,18}

Manifestasi klinis infeksi *S. typhi* muncul setelah masa inkubasi selama 5-30 hari. Tergantung dari jumlah, virulensi *S. typhi* dan daya tahan dari inang, gejala-gejala klinis dapat asimtomatis hingga kematian, namun yang sering

terjadi adalah demam, gangguan pencernaan, nyeri perut.¹⁹ Komplikasi sering kali mengikuti perjalanan penyakit apabila tidak ada tindakan intensif. Insiden terjadinya komplikasi menurun dengan pemberian antibiotik yang adekuat dan mengurangi angka kematian 18% - 4%.^{3, 20}

Demam yang ditimbulkan oleh infeksi *S. typhi* merupakan respon terhadap zat antigenik bakteri berupa lipopolisakrida (LPS) sebagai *exogenous pyrogen* yang menstimulasi monosit/makrofag dan limfosit-T menghasilkan sitokin-sitokin *proinflammatory (endogenous pyrogens)*.^{13,14} Sitokin-sitokin *proinflammatory (endogenous pyrogens)* yaitu IL-1, TNF- α , IL-6 dan IFNs yang saling berinteraksi membentuk kaskade.^{21,22}



Gambar 1. Kaskade aktifitas sitokin sebagai zat *pyrogen endogenous*
(Diambil dari : Nitea MG, dkk, *Circulating cytokines as mediators of fever*, Clinical Infectious Disease 2000; 31:S180).

Apabila *S. typhi* dapat melewati imunitas alami inang, maka akan berkembang ke jaringan limfoid di sekitar usus dan peritoneum, organ-organ lain seperti hepar dan lien serta beredar secara sistemik. Dari sini akan terjadilah patogenesis salmonellosis dan mulainya peran imunitas seluler inang.

Pada percobaan menggunakan model mencit, infeksi intravena maupun intraperitoneal *S. typhimurium* sistemik berlangsung dalam beberapa fase. Beberapa sel efektor akan berperan seperti netrofil/PMN, monosit/makrofag dan limfosit-T.^{9,23} Sel-sel tersebut akan teraktifasi dan berkomunikasi melalui sitokin-

sitokin yang terbentuk.¹⁵ Pada fase pertama, infeksi melalui intra peritoneal maupun intra vena hanya membutuhkan waktu beberapa jam saja untuk mengaktivasi imun makrofag. Fase kedua setelah satu hari infeksi disebut sebagai fase eksponensial dan imunitas seluler mulai terbentuk. Pada fase ini *Salmonella* menginvasi sel-sel hepar dan akan dihancurkan oleh netrofil.^{15, 24} Pada fase kedua ini, netrofil/PMN memegang peran penting menghambat pertumbuhan dan replikasi *Salmonella* hingga proses selanjutnya berjalan. Setelah 3-7 hari, pertumbuhan bakteri di hepar dan lien mencapai tahap *plateau* dibawah pengaruh sitokin-sitokin *proinflammatory* yang dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi.

15,16

Eksperimen untuk mengetahui pertahanan inang, berupa kemampuan *bacterial killing* telah banyak dilakukan dan dipublikasikan dengan mengukur kadar sitokin, hitung sel PMN maupun makrofag peritoneal.^{25, 26, 27, 28}

Fase *clearance* mengikuti fase *plateau*, setelah 3 minggu infeksi. Limfosit-T berperan menurunkan jumlah bakteri dalam hepar dan lien, dibuktikan oleh Matsui K. dkk.²⁹ Bahkan dengan penambahan diet kalsium menghambat pertumbuhan koloni *Salmonella* pada intestinal tikus.³⁰

II.E. BAWANG PUTIH

Tumbuhan bawang putih merupakan tanaman pertanian yang mudah tumbuh dari umbinya dan digunakan sebagai bumbu atau penyedap rasa. Bawang putih termasuk dalam famili Liliaceae. Sangat dikenal dengan nama botani *Allium sativum*. Umbi tanaman bawang putih merupakan bagian yang bermanfaat

digunakan untuk pengobatan. Dalam bidang farmasi dikenal nama simplisianya dengan bulbus *Allii sativi*.³¹

II.E.1. KHASIAT BAWANG PUTIH

Bawang putih termasuk salah satu tanaman obat yang telah lama dikenal sebagai obat tradisional terhadap beberapa penyakit disamping sebagai penyedap masakan. Kemampuan dan khasiat bawang putih sebagai obat telah sejak lama dikenal, diduga para pekerja yang membangun piramid diberikan bawang putih sebagai pencegahan terhadap demam, pada permulaan abad ke-18 di Perancis, para penggali terowongan mencampurkan bawang putih kedalam anggur untuk melindungi terhadap kelelahan dan selama perang dunia ke-2 para dokter militer memberikan bawang putih untuk mencegah gangren.^{5,6}

Penggunaan bawang putih secara tradisional adalah sebagai antihipertensi, juga telah terbukti sebagai anti kolesterolemi, mengurangi agregasi trombosit, obat batuk, antihistamin dan antimikroba. Sedangkan untuk aplikasi klinik adalah untuk mencegah dan mengobati atherosklerosis, anti agregasi trombosit sehingga mencegah tromboisis, menstabilkan kadar gula darah pada penderita diabetes melitus, mencegah infeksi intestinal.³²

Beberapa kepustakaan menuliskan aplikasi pemakaian bawang putih sebagai obat karena khasiat yang dimilikinya. Khasiat yang sangat dikenal dan telah terbukti adalah sebagai terapi atheroslerosis setelah dilakukan penelitian dan

publikasi efek antiatherosklerosis bawang putih pada tahun 1999 oleh Koscienly dkk.³²

Dari sekian banyak khasiat bawang putih yang dikenal, penelitian dan publikasi ilmiah tentang khasiat bawang putih sebagai antimikroba terhadap infeksi bakterial masih sedikit diteliti.

II.E.2. SUSUNAN KIMIA BAWANG PUTIH

Susunan kimia bawang putih cukup kompleks terdiri dari senyawa sulfur yang mana pada keadaan utuh mengandung *g*-glutamyl-*S*-alk(en)yl-*L*-cysteines and *S*-alk-(en)yl-*L*-cysteine sulfoxides, termasuk *alliin*. *g*-glutamyl peptida adalah hasil antara biosintesis yang berhubungan dengan *cysteine sulfoxides* (Lancaster and Shaw). Umumnya bawang putih mengandung 1% *alliin*, bersama (1)-*S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide (*methiin*) dan (1)-*S*-(trans-1-propenyl)-*L*-cysteine sulfoxide. *S*-(2-Carboxypropyl) glutathione, *g*-glutamyl-*S*-allyl-*L*-cysteine, *g*-glutamyl-*S*-(trans-1-propenyl)-*L*-cysteine and *g*-glutamyl-*S*-allyl-mercapto-*L*-cysteine juga ada pada umbi bawang putih. Para penyimpanan dengan suhu sejuk, *alliin* terkumpul secara alami. Rata-rata satu siung bawang putih berisi lebih dari 0.9% *g*-glutamylcysteines dan lebih dari 1.8% *alliin*.³³

Bawang putih sangat dikenal dengan baunya yang khas, yang berasal dari *allicin* dan komponen sulfur lain. Komponen yang bersifat volatil terdapat dalam bawang putih termasuk *diallylsulfide* (DAS), *diallyl disulfide* (DADS), *diallyl trisulfide*, *methyl allyl disulfide*, *methyl allyl trisulfide*, 2-vinyl-1,3-dithiin, 3-vinyl-1,2-dithiin dan *ajoene*.³³ Pada saat bawang putih diproses baik dengan memotong

ataupun digerus komponennya akan terkonversi menjadi senyawa organosulfur dalam jangka waktu singkat dan pada penghancuran bawang putih, alliinase sebagai enzim vakuola segera melisikan alliin membentuk allicin, suatu senyawa berminyak, tak berwarna mengandung 70–80% thiosulfinate, tidak stabil. Allicin sering disalahartikan dengan minyak bawang karena sebenarnya tidak terdapat pada bawang utuh atau produknya.^{23, 24}

Sejak allicin ditemukan oleh Cavallito and Bailey (1944), saat itu dikembangkan penggunaannya sebagai antibiotik, bahkan saat ini di Amerika dipatenkan sebagai antibiotik dan anti jamur.²⁴ Di Amerika Serikat penggunaan ekstrak bawang putih sebagai suplemen menempati urutan tertinggi dibanding penggunaan tanaman herbal lainnya seperti yang dilaporkan oleh Wingate.²⁴

II.E.3. EKSTRAKSI DAN BIOAVAILABILITAS BAWANG PUTIH

II.E.3.a. EKSTRAKSI

Untuk mendapatkan ekstrak, bawang putih utuh atau irisan dicampur dalam larutan ekstraksi (misal dalam air atau alkohol) dalam beberapa saat. Setelah dipisahkan dari larutan ekstrak yang terbentuk dikonsentrasikan dan langsung digunakan atau dibuat dalam bentuk serbuk.²⁴ Ekstrak, khususnya *Aged Garlic Extract*, berisi konstituen mengandung sulfur yang larut air lebih banyak dibanding komponen yang larut minyak.³³ *Aged garlic extract* diproses dengan cara berbeda dari tiga komponen bawang putih. Selama proses *aging*, sifat bawang putih yang berbau khas, menyengat dan iritatif terkonversi secara alami

menjadi komponen stabil yang mengandung sulfur yang digunakan sebagai standart karena sifat bioabilitasnya.³³ Ravid dan Putievsky memperkenalkan metoda preparasi minyak bawang putih dengan melakukan distilasi selama 3 jam dalam 100 liter pelarut menggunakan alat *direct steam pilot* tanaman dihasilkan 2,2-4,3 gram minyak/kg bawang putih.⁷

II.E.3.b. BIOAVAILABILITAS BAWANG PUTIH

Bioavailabilitas komponen aktif dalam bawang putih sangat esensial. *S-allylcystein* (SAC) adalah satu komponen organosulfur terlarut dalam bawang putih. Konsentrasinya meningkat selama ekstraksi. Secara farmakokinetik, SAC dapat dideteksi dalam plasma, hepar dan ginjal setelah dimakan. Bioavailabilitas SAC adalah 93,0% pada mencit, 98,2% pada tikus dan 87,2% pada anjing.³³

Komponen organosulfur lain yang larut minyak dalam bawang putih, termasuk allicin, sulfida, ajoene dan *vinylidithiins*, tidak didapatkan dalam darah atau urine walaupun makan dalam jumlah besar. *Diallyl disulfide* (DADS) adalah metabolit dari allicin. Konsentrasi maksimum DADS yang dilabel radioaktif dalam hepar mencit terdeteksi 90 menit setelah dilakukan pemberian secara intraperitoneal.³³

II.F. PENGARUH BAWANG PUTIH TERHADAP IMUNITAS

Publikasi tentang penggunaan bawang putih telah dikenal luas karena memiliki potensi menurunkan resiko berbagai penyakit, pemakaian sebagai antioksidan melalui mekanisme *scavenging reactive oxygen species* (ROS), meningkatkan aktivitas enzim-enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase. Seperti telah diketahui bahwa oksidasi menyebabkan modifikasi DNA, protein, lipid dan molekul-molekul sel oleh *reactive oxygen species* (ROS) dan memegang peran dalam proses timbulnya penyakit dan kondisi yang berkaitan dengan penuaan.³⁴

Kebanyakan ROS diproduksi sel dengan cara : 1. respirasi normal aerobik dalam mitokondria, yang menghasilkan *superoxide radical* (O_2^-) dan mengeluarkan produk-produk toksik, *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *reactive hydroxyl radical* (OH_2) yang tinggi, 2. makrofag yang terstimulasi dan lekosit PMN, yang mengeluarkan *superoxide* dan *nitric oxide radical* (NO_2), 3. peroksisom, organela sel yang memproduksi H_2O_2 sebagai produk degradasi asam lemak dan molekul lainnya, dan 4. oksidan sebagai produk induksi dari enzim sitokrom P_{450} .³²

Bawang putih merupakan tumbuhan yang mempunyai efek antimikroba (fitofarmaka) yang mengandung allicin, alliin, dan ajoene termasuk dalam klas sulfoxide dan terpenoid.^{24, 35}

Pada eksperimen in-vivo maupun in-vitro seperti dilaporkan Colic dkk., pemberian ekstrak bawang putih yang berbeda yaitu *garlic aqueous extract* (GAE)

dan *garlic ethanolic extract* (GEE) didapatkan peningkatan stimulasi proliferasi kultur sel timus dan splenosit yang telah distimulasi dengan concanavalin-A (Con-A) secara signifikan. Efek stimulasi GAE lebih kuat dibanding GEE terhadap splenosit pada konsentrasi suboptimal Con-A.³⁶

Schwartz IF dkk melaporkan aktivitas inhibisi allicin terhadap iNOs myosit jantung tikus melalui dua mekanisme yang berbeda yaitu pada konsentrasi rendah (10 μ M) menurunkan *level* iNOs mRNA, namun pada konsentrasi tinggi (40 μ M) akan menghambat transport arginine melalui *down-regulation* dari *cationic amino-acid transporter-2* (CAT-2) mRNA.³⁷

Percobaan untuk mengetahui efek seluler ekstrak bawang putih dilakukan dengan menyelidiki kemampuan diapedesis dari leukosit sebagai salah satu efektor sistem imunitas seluler alami. Eksperimen ini ditujukan untuk mengevaluasi proses inflamasi. Dilaporkan bahwa ekstrak bawang putih merupakan induktor migrasi leukosit menembus sel endotel *monolayer*.³⁸ Selain itu ekstrak bawang putih sangat berguna untuk mencegah kerusakan dinding lien yang diinduksi oleh penurunan fungsi sel NK.³⁹

II.G. PENGARUH INFEKSI SALMONELLA TERHADAP PRODUKSI NITRIT OKSIDA

Umezawa K dkk. dalam percobaan mereka menyimpulkan bahwa NO merupakan salah satu mediator dalam mekanisme pertahanan terhadap *S. typhimurium* selain superoksida anion (O_2^-). Pada dosis 50% LD₅₀ 2×10^5 *S. typhimurium* mencapai puncak pertumbuhan di hepar dalam tiga hari sesuai

dengan gambaran histologik berupa mikroabses dengan lesi granulosomatous yang mana didapatkan sel Poli Morfo Nuklear yang mengekspresikan iNOs disekitar mikroabses. Disimpulkan bahwa NO mempunyai peranan penting dalam mekanisme antimikroba melawan *S. typhimurium*.⁴⁰

Pada eksperimen lain, infeksi *S. typhimurium* menginduksi *NK-dependent pathway* untuk mensupresi produksi NO. Kadar NO dan IFN- γ pada mencit meningkat pada hari 3-7 setelah inokulasi. Hewan coba dengan deplesi sel NK dengan pemberian IFN- γ mengembalikan produksi NO pada level semula.⁴¹

Huang dkk. melaporkan percobaan mereka menggunakan *S. typhimurium* bahwa NO mensupresi limfosit-T terhadap mitogen concanavalin-A (Con-A) dan secara in-vitro NO mensupresi kapasitas respon splenosit terhadap *Plaque-forming-cell* (PFC) eritrosit domba.⁴²

Respon imun seluler pada infeksi *S. typhimurium* dipengaruhi oleh sitokin. *Interleukin-12* (IL-12) memperkuat kapasitas respon supresi terhadap *Plaque-forming-cell* (PFC) splenosit normal. IL-12 menginduksi produksi nitrit dalam hal ini NO menjadi perantara imunosupresi selama infeksi *S. typhimurium* dengan menstimulasi produksi IFN- γ oleh *makrofag adherent* dari mencit dengan *salmonellosis*.⁴³

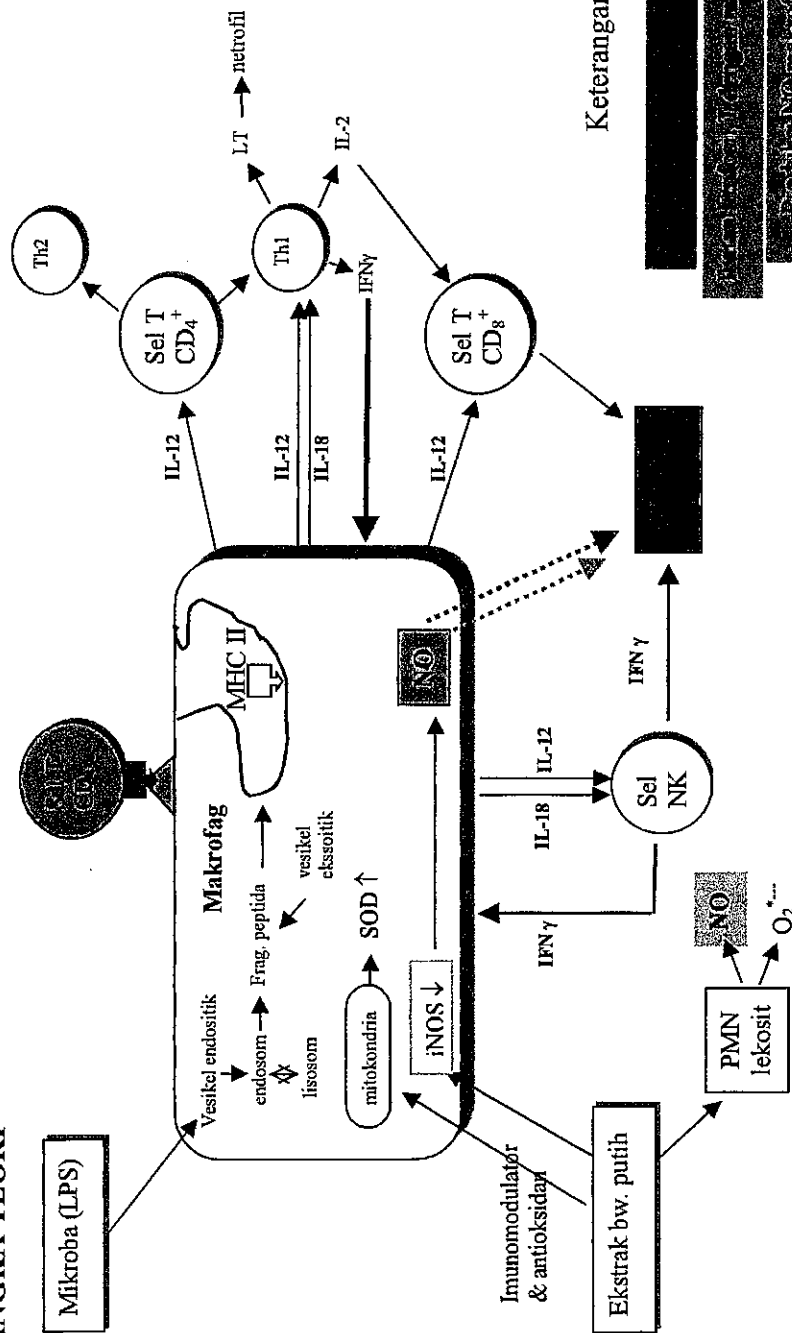
Interleukin-18 (IL-18) menunjukkan aktifitas modulasi IFN- γ dari splenosit mencit, menginduksi TNF- α dari sel NK and limfosit-T. Pada infeksi *Salmonella*, dengan pemeriksaan imunohistokimia splenosit dan makrofag peritoneal melepaskan IL-18, hal ini dibuktikan dengan pemberian anti-IL-18 antibodi menyebabkan eksaserbasi infeksi.^{20,44}

Pada kondisi yang berat invasi ke organ-organ lain dapat mencapai otak, sumsum-tulang dan paru. Endotoksin akan menyebabkan endotoksemia dan terjadi odema paru. Percobaan dengan inhalasi NO menggambarkan efek terapi pada edema paru yang disebabkan endotoksin dari *S. typhimurium*.⁴⁵

BAB III

KONSEP DAN HIPOTESIS

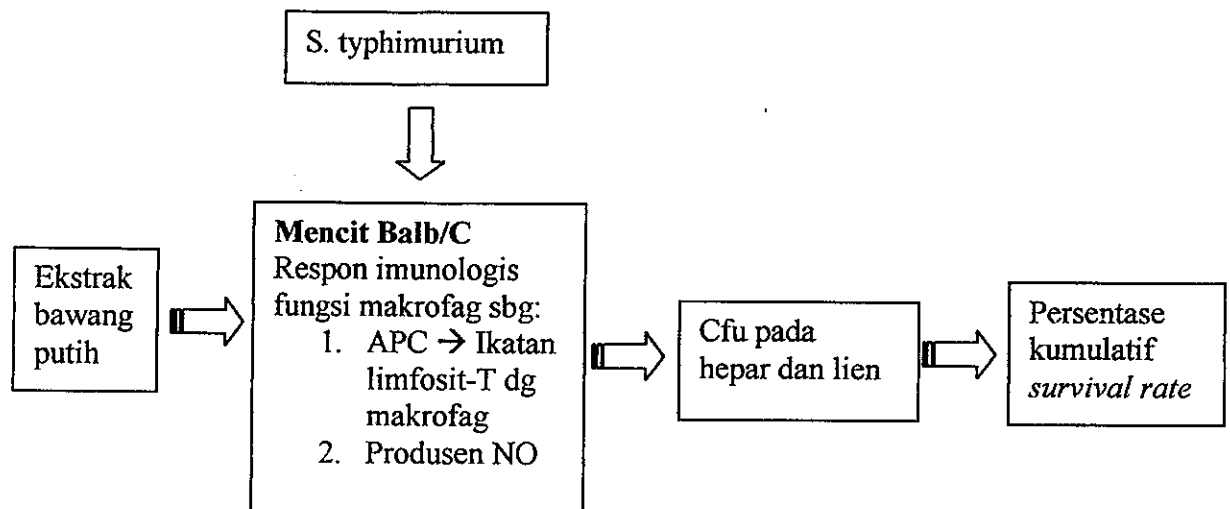
III. A. KERANGKA TEORI



Keterangan :

26

III.B. KERANGKA KONSEP



III.C. HIPOTESIS

1. Hitung kuman pada hepar dan lien, pada kelompok mencit yang diberi ekstrak bawang putih akan lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol
2. Jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag kelompok mencit yang diberi ekstrak bawang putih akan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol
3. Produksi NO makrofag kelompok mencit yang diberi ekstrak bawang putih akan lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol
4. Persentase kumulatif *survival rate* kelompok mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol.

BAB IV

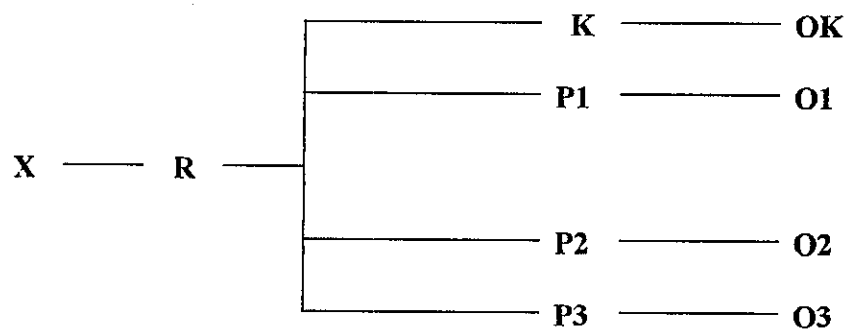
METODE PENELITIAN

IV.A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan pendekatan *The Post Test - Only Group Design* dan *Survival Study* menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.

Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), dengan metode randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Perlakuan adalah pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis bervariasi dengan keluaran adalah perubahan respon imunitas seluler dan *survival rate*.

I. Penelitian respon imunitas seluler



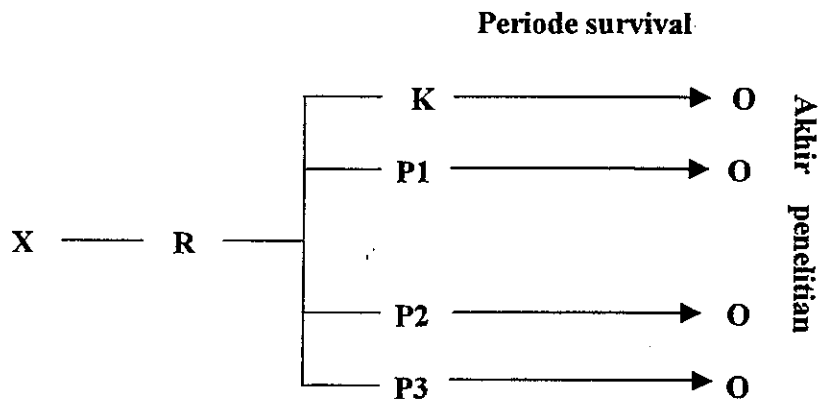
Keterangan:

$X \rightarrow R$ = Masa adaptasi selama 1 minggu

R = Randomisasi

- K = Kontrol, sebagai pembanding, mencit diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal
- P1 = Mencit diberikan 1 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal
- P2 = Mencit diberikan 2 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal
- P3 = Mencit diberikan 4 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal
- OK = hari ke-11 mencit kelompok kontrol dibunuh untuk pemeriksaan laboratoris
- O1 = hari ke-11 kelompok mencit dengan perlakuan (P1) dibunuh untuk pemeriksaan laboratoris
- O2 = hari ke-11 kelompok mencit dengan perlakuan (P2) dibunuh untuk pemeriksaan laboratoris
- O3 = hari ke-11 kelompok mencit dengan perlakuan (P3) dibunuh untuk pemeriksaan laboratoris

II. Pengamatan Survival



Keterangan:

$X \rightarrow R$ = Masa adaptasi selama 1 minggu

R = Randomisasi

K = Kontrol, sebagai pembanding, mencit diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal

P1 = Mencit diberikan 1 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal

P2 = Mencit diberikan 2 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal

P3 = Mencit diberikan 4 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* intra peritoneal

O = Pengamatan survival rate mencit keempat kelompok

IV.B. POPULASI DAN SAMPEL

IV.B.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit galur murni strain Balb/C

IV.B.2. SAMPEL

Sampel penelitian ini adalah mencit jantan galur murni strain Balb/C berusia umur 8-12 minggu. Strain mencit yang dipilih adalah Balb/C karena sensitif terhadap infeksi *S. typhimurium* dan dilaporkan dapat menimbulkan respon imunitas seluler apabila mencit tersebut diinfeksi dengan *S. typhimurium*.

Kuman *S. typhimurium* banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Mekanisme imun yang berperan melawan *S. typhimurium* terutama adalah *T cell-mediated immunity*.

IV.C. VARIABEL PENELITIAN

IV.C.1. VARIABEL BEBAS:

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini berupa pemberian ekstrak bawang putih.

IV.C.2. VARIABEL TERGANTUNG:

Sebagai variabel tergantung adalah respon imunitas seluler berupa hitung kuman dari organ hepar dan lien, jumlah ikatan limfosit-T dengan makrofag, dan produksi NO.

1. Kuman dihitung dalam cfu (*colony forming unit*)/gram. Skala kontinyu.
2. Ikatan limfosit-T dengan makrofag dihitung dari jumlah limfosit yang berikatan dengan makrofag setiap 100 sel. Skala kontinyu.
3. Produksi NO makrofag diukur dari jumlah NO yang dihasilkan dengan metode Griess. Skala kontinyu.
4. Persentase kumulatif survival mencit

IV.D. BAHAN

- Mencit jantan strain BALB/c, umur 8-12 minggu, diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Jogjakarta.
- *S. typhimurium* (phage type 510) dalam media nutrien broth (BHI Oxoid) diperoleh dari Unit Mikrobiologi RS Telogorejo Semarang.
- Ekstrak bawang putih yang diperoleh dari PT Sido Muncul Semarang
- *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dari mencit strain BALB/c
- Media Salmonella-Shigella agar
- *Foetal Bovine Serum* (FBS)
- Metanol, Larutan Giemsa

- N-(-1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED)
- Penicillin
- Standar Nitrit
- Pakan standar
- RPMI
- Reagens Gries : Reagens I & II dan larutan standart NaNO_2

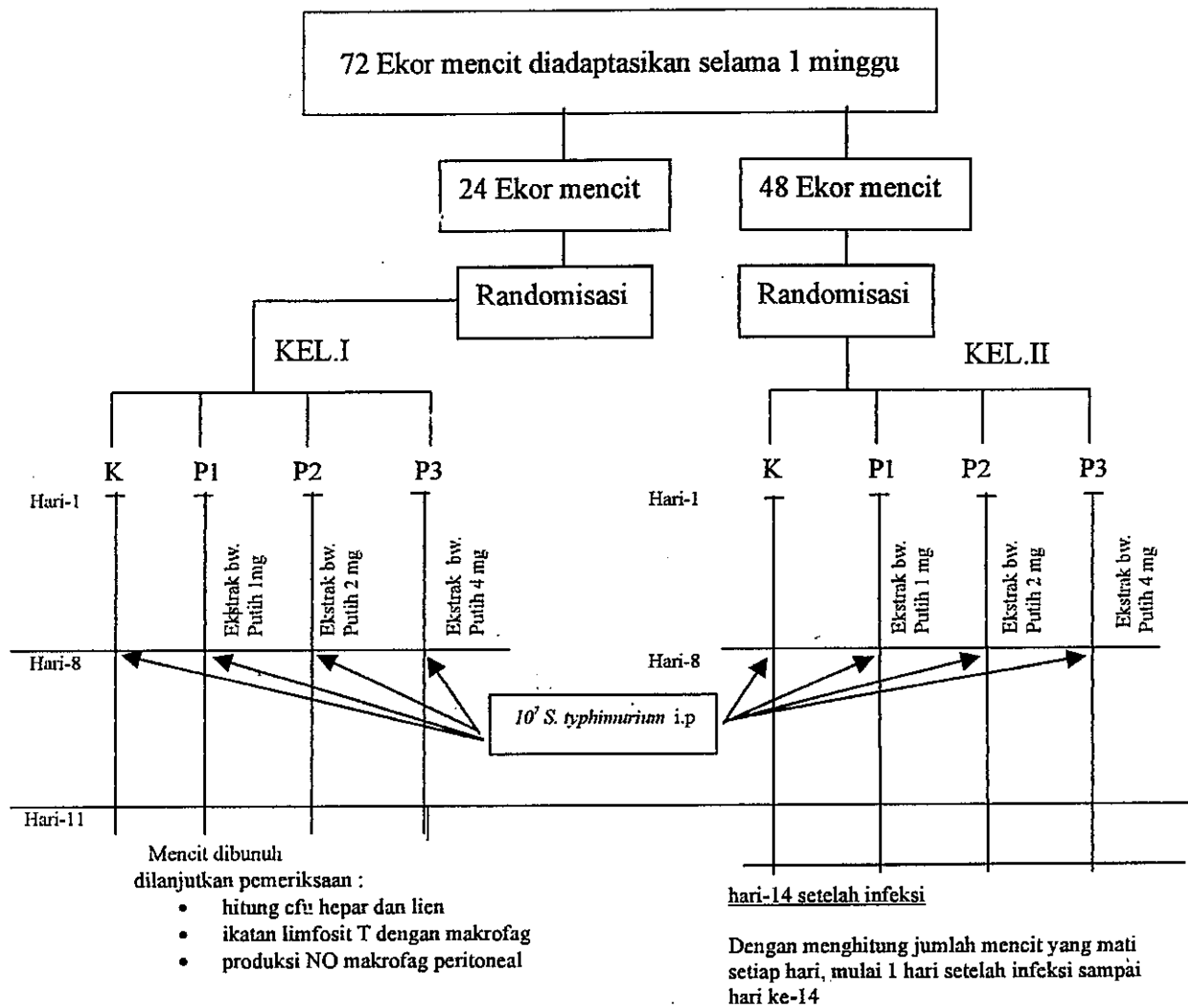
IV.E. ALAT/ INSTRUMEN PENELITIAN.

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| ▪ Mikroskop | ▪ Inkubator buatan Schwabach |
| ▪ Sduit disposable 1 ml, 3 ml | ▪ Termometer |
| ▪ Tabung Reaksi | ▪ Tabung reaksi dengan alas datar |
| ▪ Cawan Petri | ▪ Gelas obyek dan <i>cover slip</i> |
| ▪ Kanul mulut | ▪ Pinset |
| ▪ Timbangan digital | ▪ Sarung tangan |
| ▪ Kandang hewan coba individual | ▪ Microplate 96 well dasar rata |
| ▪ Elisa reader/spektrofotometer | ▪ Alat sentrifugasi Sigma |
| | berpendingin |

kuman organ hepar dan lien, ikatan limfosit-T dengan makrofag dan produksi NO makrofag.

Kelompok II (*survival study*), 48 ekor mencit dibagi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 12 ekor mencit dengan perlakuan sama seperti kelompok I namun pemberian larutan ekstrak bawang putih diberikan hingga akhir pengamatan yaitu sampai hari ke-14 setelah infeksi.

IV.H. ALUR KERJA



IV.1. PEMERIKSAAN

PROSEDUR PENGAMBILAN SAMPEL DARI HEWAN PERCOBAAN

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose dengan chloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%.
2. Sepuluh ml medium RPMI yang mengandung 2% FBS disuntikkan ke dalam rongga peritoneum, ditunggu 2 menit sambil ditekan-tekan perlahan.
3. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.
 - a. Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada kecepatan 400g, suhu 4°C selama 10 menit.
 - b. Supernatan dibuang, cuci 2X dengan RPMI yang mengandung 2% FBS
 - c. Kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI komplet (RPMI 1640 yang mengandung *L-glutamin* (1mM), *Foetal Bovine Serum* (FBS) 5% dan ditambah antibiotika Penicillin 50 unit dan Streptomycin 50µg per ml) dan disentrifus pada kecepatan 400g, suhu 4°C selama 10 menit.

- d. Buang supernatan dan dilarutkan dengan NH_4Cl dalam PBS untuk melisis sel darah merah kemudian disentrifus pada kecepatan 400g, suhu 4°C selama 10 menit.
- e. Dicuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
- f. Resuspensi dengan medium komplit.
- g. Jumlah sel makrofag yang didapat dihitung menggunakan bilik hitung Neubauer hingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan $10^6/\text{ml}$.
- h. Sel yang didapatkan ini dibagi dua, masing-masing digunakan untuk :
 - 1. Pemeriksaan ikatan limfosit-T dengan makrofag ($500\mu\text{l}$)
 - 2. Pemeriksaan produksi NO ($3 \times 100\mu\text{l}$).
- 4. Peritoneum dibuka, hepar dan lien diambil secara aseptis untuk dilakukan hitung kuman.

IV.I.1. PEMERIKSAAN HITUNG KUMAN HEPAR DAN LIEN

- 1. Diambil sebagian hepar dan lien untuk masing-masing sampel dan dilakukan penimbangan.
- 2. Jaringan dihancurkan dalam mortir dengan menambahkan 1 cc NaCl fisiologis steril.
- 3. Disiapkan 6 buah tabung untuk pengenceran bertingkat yang masing-masing berisi 4,5 ml NaCl fisiologis steril.

IV.F. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di :

- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada bulan Februari 2003.
- Laboratorium Bioteknologi dan GAKI Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada bulan Maret 2003.
- Balai Laboratorium Kesehatan Semarang pada bulan Maret 2003.

IV.G. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

1. Mencit jantan strain Balb/C sejumlah 72 ekor, umur 8-12 minggu, diaklimatisasi di laboratorium selama satu minggu dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar dan minum *ad libitum*.
2. Mencit tersebut dibagi menjadi 2 kelompok masing-masing 24 ekor untuk kelompok pemeriksaan imunitas seluler dan 48 ekor untuk kelompok penelitian survival. Masing-masing kelompok ditentukan secara acak dengan komputer dan masing-masing dikandangkan secara individual.

Kelompok I, 24 ekor mencit dibagi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit:

1. Kelompok pertama (kontrol), mencit diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* (phage type 510) intra peritoneal pada hari ke-8, hari ke-11 mencit dibunuh untuk diperiksa hitung kuman organ hepar dan lien, ikatan limfosit-T dengan makrofag dan produksi NO makrofag.
2. Kelompok kedua (P1), mencit diberikan 1 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* (phage type 510) intra peritoneal, hari ke-11 mencit dibunuh untuk diperiksa hitung kuman organ hepar dan lien, ikatan limfosit-T dengan makrofag dan produksi NO makrofag.
3. Kelompok ketiga (P2), mencit diberikan 2 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, pada hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* (phage type 510) intra peritoneal, hari ke-11 mencit dibunuh untuk diperiksa hitung kuman organ hepar dan lien, ikatan limfosit-T dengan makrofag dan produksi NO makrofag.
4. Kelompok keempat (P3), mencit diberikan 4 mg ekstrak bawang putih dalam 1 ml pelarut per oral setiap hari selama 10 hari, hari ke-8 diinfeksi dengan 10^7 *S. typhimurium* (phage type 510) intra peritoneal, hari ke-11 mencit dibunuh untuk diperiksa hitung

4. Dimasukkan 0,5 ml larutan dari mortir ke tabung I dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex.
5. Diambil 0,5 ml larutan dari tabung I kemudian dimasukkan ke tabung II dan seterusnya dilakukan prosedur yang sama sampai tabung VI sehingga telah dilakukan pengenceran 1:10 untuk tiap tingkat pengenceran. Pada tabung terakhir diambil 0,5 ml untuk dibuang. Semua proses ini dilakukan dalam laminar flow.
6. Diinokulasikan 0,1 ml dari masing-masing tabung pengenceran pada medium SS (*Salmonella-Shigella*) dengan cara *surface spreading*, kemudian diinkubasikan dalam inkubator 37°C selama 24 jam.
7. Hitung jumlah koloni pada masing-masing *plate* pengenceran yang berisi 30–300 Cfu.
8. Cfu/gram jaringan dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah Cfu} \times \text{Pengenceran} \times 10 \text{ (karena inokulasinya hanya 0,1ml per plate)}}{\text{Berat Jaringan}}$$

IV.1.2. PEMERIKSAAN IKATAN LIMFOSIT-T DENGAN MAKROFAG

Untuk mengetahui kemampuan makrofag sebagai sel penyaji, dihitung jumlah limfosit-T yang berikatan dengan makrofag menggunakan metode dari Lipscomb yang dimodifikasi menurut Ziegler.^{47, 48}

Pada prinsipnya sel makrofag sebagai *adherent cells* akan menempel pada kaca benda, sehingga limfosit yang berikatan dengan makrofag akan turut menempel dan tercat dengan pewarnaan Giemsa. Sedangkan limfosit-limfosit lain yang tidak berikatan dengan makrofag akan terbilas pada saat pencucian, sebab limfosit adalah *non adherent cells* yang tidak menempel dengan kuat pada kaca benda.

1. *Peritoneal Exudat Cells* sejumlah 5×10^5 dalam 2 ml medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam dalam tabung kaca yang pada dasarnya diberi kaca benda. ($500\mu\text{l}$ 10^6 sel/ml ditambah medium sampai 2 ml).
2. Setelah diinkubasi selama 2 jam, suspensi *non adherent cells* dipindahkan ke tabung kaca yang lain (sebagai *Peritoneal Exudat Lymphocyt*). Kaca benda yang terdapat pada dasar tabung dicuci dengan PBS sehingga hanya *adherent cells* yang menempel pada kaca benda tersebut.
3. Tiga per sepuluh ml dari 10^7 *S. typhimurium* yang mati karena pemanasan pada suhu 63°C selama 2 jam (*heat killed*) ditambahkan ke makrofag yang diberi 2 ml medium kultur lalu disentrifus selama 5 menit pada suhu 20°C dengan kecepatan 800g.
4. Makrofag tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Makrofag yang telah mendapat perlakuan tersebut disebut *S. typhimurium pulsed macrophages*.

5. Dilakukan 3 kali pencucian dengan FBS.
6. Sepuluh pangkat lima *PEL* dari mencit yang sama dalam 2 ml medium ditambahkan ke dalam makrofag tersebut dan disentrifus 50g, 4 menit, 4°C.
7. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
8. Dilakukan pencucian 2 kali dengan PBS.
9. *Slide* tersebut difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan giemsa 20% selama 20 menit.
10. Jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag ditentukan dengan menghitung jumlah limfosit yang berikatan pada 100 makrofag.

IV.1.3. PEMERIKSAAN PRODUKSI NO⁴⁹

Prosedur pemeriksaan :

1. Dimasukkan 100 µl suspensi $1-1,2 \times 10^6$ sel/ml dalam setiap sumuran plate kultur berisi 96 sumuran.
2. Diinkubasi selama 2-3 jam pada suhu 37°C, 5%CO₂ untuk *makrofag adherent*.
3. Sel-sel non adherent dibuang dengan cara diaspirasi
4. Ganti medium
5. Sel dikultur dalam medium komplit selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C, 5%CO₂

6. Pengukuran akumulasi nitrit pada supernatan kultur sebagai berikut :

- Untuk memeriksa produksi nitrit digunakan 96 well microplate dengan dasar rata.
- Dimasukkan 100 µl Reagen Gries dalam sumuran microplate datar.
- Pipet 100 µl supernatan yang hendak diperiksa atau standart NaNO_2 dimasukkan dalam sumuran dengan triplikasi. Medium kontrol digunakan sebagai blangko.
- Ditunggu selama 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan distabilisasi.
- Ukur absorbansi pada 550 nm menggunakan ELISA reader (*automated microplated reader*)
- Dibuat kurva standar menggunakan analisa regresi linier sederhana dari pembacaan standar NaNO_2 . Konsentrasi sampel dihitung berdasarkan kurva standar atau rumus regresi.

Keterangan:

Reagen chromogenic

Merupakan campuran 1 volume Reagen I dan 1 volume Reagen II sebagai berikut:

Reagen I. N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,1 gram dilarutkan dalam 100 cc air suling

Reagen II. Sulfanilic Acid 0,2 gram dilarutkan dalam 100 ml HCL 4N.

Reagen I dan II tersebut harus disimpan di dalam almari pendingin, ruangan gelap dan digunakan sebelum 6 minggu/ sebelum reagen berubah menjadi gelap. Setiap kali pemeriksaan harus disiapkan fresh (segar).

Standar

Larutkan 69mg NaNO_2 dalam 500ml air suling (stok 2mM).

Buat pengenceran bertingkat dari 0 - 200µM dengan cara melarutkan larutan stok dengan medium yang sama dengan medium kultur.

IV.I.4. PENGAMATAN SURVIVAL KELOMPOK II

Mengamati *survival rate* tiap kelompok selama 14 hari setelah infeksi.

IV.J. ANALISA DATA

Data yang terkumpul diedit, dikoding dan dientry dalam file komputer.

Setelah di-*cleaning* data dianalisis secara statistik yang meliputi :

1. Analisis deskriptif dengan menampilkan diagram dot-plot dan tabel silang menurut keempat kelompok intervensi.
2. Analisis analitik dengan melakukan uji normalitas distribusi menurut kelompok intervensi dengan uji *Shapiro-Wilk*. Pada penelitian ini distribusi datanya tidak normal sehingga dilakukan analisis non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis* untuk melihat adanya perbedaan pada keempat kelompok intervensi. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Mann-Whitney* apabila didapatkan ada perbedaan yang bermakna antara 4 kelompok intervensi. Pada kelompok perlakuan P1 dan P2 didapatkan masing-masing seekor yang mati sebelum akhir penelitian, sehingga di-*drop out*. Kurva survival mencit diuji dengan metoda *Kaplan-Meier*, dan perbedaan kurve survival antara kelompok penelitian diuji dengan metode *Log-rank*. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p < 0,05$ dengan power penelitian 80% dan interval kepercayaan 95%. Semua uji statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 10.05 for windows.

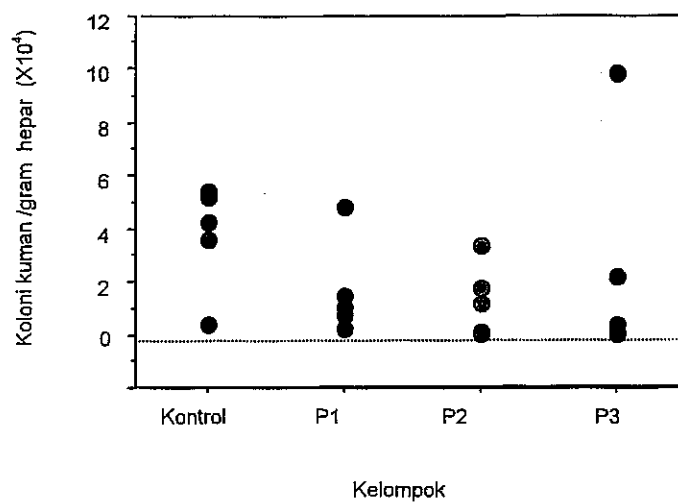
BAB V

HASIL PENELITIAN

Penyajian hasil penelitian tersusun berurutan dari hasil hitung koloni kuman organ hepar dan lien, hasil pemeriksaan sediaan mikroskopik berupa jumlah ikatan limfosit dengan makrofag, hasil pengukuran kadar NO makrofag dan hasil uji kesintasan. Masing-masing akan ditampilkan dalam diagram dan tabel silang menurut kelompok intervensi.

V. A. HITUNG KOLONI KUMAN

V.A.1. Hitung koloni kuman hepar



Gambar 2. Diagram dot-plot koloni kuman/gram hepar

Gambar 2 menunjukkan sebaran data hitung jumlah koloni kuman kelompok kontrol, P1, P2 dan P3. Pada kelompok P3 tampak adanya nilai ekstrem. Secara

umum didapat hitung jumlah koloni kuman pada seluruh kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih rendah dibanding kelompok kontrol.

Tabel 1. Hasil penghitungan koloni kuman dalam cfu/gram hepar

Kelompok	N	Jumlah koloni kuman hepar			p [*]
		Mean (10 ⁴)	Std. Deviasi (10 ⁴)	Median (10 ⁴)	
Kontrol	6	3,86	1,82	4,26	-
Perlakuan 1	5	1,70	1,84	1,03	0,18
Perlakuan 2	5	1,33	1,39	1,21	0,03
Perlakuan 3	6	2,12	3,88	0,24	0,09

* uji Mann-whitney kelompok perlakuan vs kontrol

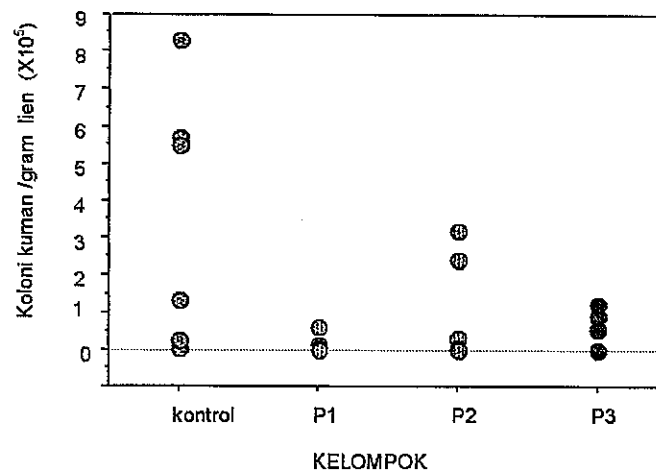
Pada tabel 1 tampak jumlah rata-rata koloni kuman hepar pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Rerata jumlah koloni kuman hepar paling tinggi didapatkan pada kelompok kontrol, yaitu sebesar $(3,86 \pm 1,82) \times 10^4$ cfu/gram.

Hasil uji statistik *Kruskal-wallis* didapatkan perbedaan tidak bermakna ($p=0,13$) pada hitung jumlah koloni kuman hepar antar kelompok intervensi.

Uji *Mann-whitney* sebagai kelanjutan dari uji *Kruskal-wallis*, menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna terhadap hitung jumlah koloni kuman hepar antara kelompok kontrol dengan kelompok P1 ($p=0,18$) dan antara kelompok kontrol dengan kelompok P3 ($p=0,09$), kecuali antara kelompok kontrol dengan kelompok P2 terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,03$).

Dengan demikian disimpulkan bahwa pemberian ekstrak bawang putih 2 mg per hari dapat menurunkan jumlah koloni kuman hepar.

V.A.2. Hitung koloni kuman lien



Gambar 3. Diagram dot-plot koloni kuman/gram lien

Gambar 3 menunjukkan sebaran data hitung jumlah koloni kuman/gram lien kelompok kontrol, P1, P2 dan P3. Pada kelompok kontrol tampak data lebih menyebar dibanding kelompok P1, P2 dan P3. Data kelompok P1 dan P3 tampak lebih homogen dibanding kelompok kontrol dan P3. Secara umum didapat hitung jumlah koloni kuman pada seluruh kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih rendah dibanding kelompok kontrol.

Tabel 2. Hasil penghitungan koloni kuman dalam cfu/gram lien

Kelompok	N	Jumlah koloni kuman lien			p ^{***}
		Mean (10 ⁵)	Std. Deviasi (10 ⁵)	Median (10 ⁵)	
Kontrol	6	3,54	3,46	3,43	-
Perlakuan 1	5	0,02	0,27	0,02	0,05
Perlakuan 2	5	1,20	1,52	0,32	0,33
Perlakuan 3	6	0,45	5,40	0,28	0,07

Pada tabel 2 tampak jumlah rata-rata hitung kuman lien pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Rerata jumlah koloni kuman lien yang paling banyak yaitu pada kelompok kontrol yaitu sebesar $(3,54 \pm 3,46) \times 10^5$ cfu/gram.

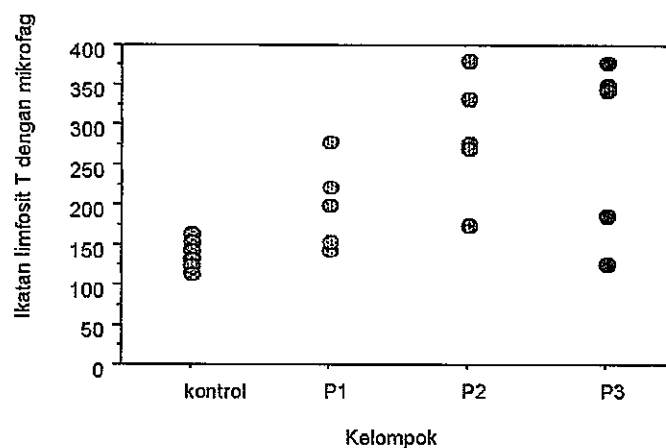
Hasil uji statistik *Kruskal-wallis* didapatkan perbedaan tidak bermakna ($p=0,13$) pada jumlah koloni kuman lien antar kelompok intervensi.

Uji *Mann-whitney* sebagai kelanjutan dari uji *Kruskal-wallis*, menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna terhadap jumlah koloni kuman lien antara kelompok kontrol dengan kelompok P2 ($p=0,34$), antara kelompok kontrol dengan kelompok P3 ($p=0,07$), namun antara kelompok kontrol dengan kelompok P1 terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,05$).

Disimpulkan bahwa pemberian ekstrak bawang putih 1 mg per 1ml pelarut dapat menurunkan jumlah koloni kuman lien.

V. B. HASIL HITUNG JUMLAH IKATAN LIMFOSIT T - MAKROFAG

Penghitungan jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag dilakukan dengan cara menghitung jumlah limfosit T yang berikatan pada 100 sel makrofag. Setelah dilakukan pemeriksaan mikroskopis secara seksama pada semua preparat, didapatkan hasil seperti tampak pada diagram dan tabel silang berikut:



Gambar 4. Diagram dot-plot jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag

Gambar 4 menunjukkan sebaran data jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag pada kelompok kontrol, P1, P2 dan P3. Tampak data pada kelompok kontrol lebih homegen dibanding kelompok P1, P2 dan P3. Rentang variasi data terbesar dijumpai pada kelompok P3.

Tabel 3. Jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag

Kelompok	N	Jumlah Ikatan Limfosit T dengan makrofag			p *
		Mean	Std. Deviasi	Median	
Kontrol	6	139,00	18,71	139,00	-
Perlakuan 1	5	200,00	54,51	200,00	0,03
Perlakuan 2	5	288,33	77,24	278,00	<0,001
Perlakuan 3	6	288,77	104,75	345,00	0,03

* uji Mann-whitney kelompok perlakuan vs kontrol

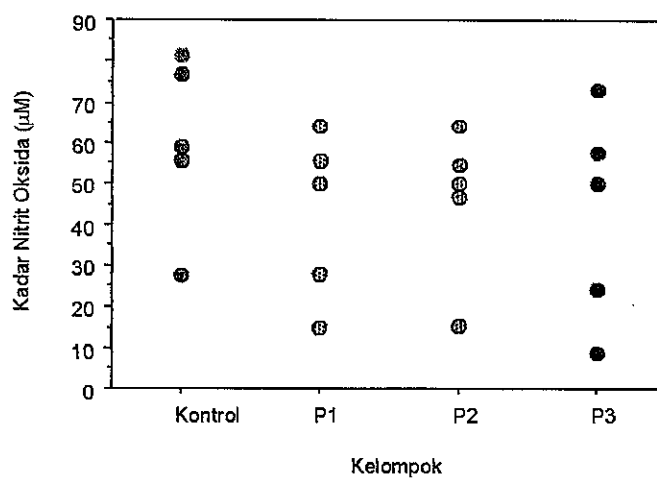
Dari hasil penelitian didapatkan rata-rata jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag pada kelompok kontrol, yaitu sebesar $139,00 \pm 18,71$ sedangkan pada kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak bawang putih (P1, P2, P3) ternyata lebih tinggi, yaitu kelompok P1: $200,00 \pm 54,51$, kelompok P2: $288,33 \pm 77,24$ dan kelompok P3: $288,77 \pm 104,75$.

Analisa statistik data penelitian dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,01$) pada jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag antar kelompok percobaan yang terdiri dari 4 kelompok.

Perbedaan lebih lanjut antara kelompok kontrol dengan setiap kelompok perlakuan dianalisis dengan uji *Mann-Whitney*. Perbandingan antara kelompok kontrol dengan kelompok P1 didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,03$) seperti halnya pada kelompok P2 dengan $p<0,001$ dan kelompok P3 dengan $p=0,03$.

V.C. HASIL PENGUKURAN PRODUKSI NO MAKROFAG

Kadar NO dari sampel tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan metode modifikasi *Gries* dari *Green et al.* Dari hasil penelitian didapatkan kadar NO makrofag sebagai berikut:



Gambar 5. Diagram dot-plot kadar NO

Tabel 4. Kadar NO

Kelompok	N	Kadar NO (µM)			p [*]
		Mean	Std. Deviasi	Median	
Kontrol	6	59,58	19,06	57,56	-
Perlakuan 1	5	42,72	20,60	50,26	0,25
Perlakuan 2	5	46,27	18,41	50,28	0,18
Perlakuan 3	6	39,69	24,42	37,22	0,13

* uji Mann-whitney kelompok perlakuan vs kontrol

Dari hasil penelitian didapatkan konsentrasi produksi NO makrofag pada kelompok kontrol didapatkan sebesar $59,58 \pm 19,06 \mu\text{M}$, sedangkan konsentrasi produksi NO makrofag pada kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) ternyata lebih rendah, yaitu kelompok P1: $42,71 \pm 20,60 \mu\text{M}$, kelompok P2: $46,28 \pm 18,41 \mu\text{M}$, dan kelompok P3: $39,69 \pm 24,42 \mu\text{M}$.

Setelah dilakukan analisa statistik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, ternyata didapatkan perbedaan tetapi tidak signifikan ($p=0,37$) pada konsentrasi produksi NO makrofag antar kelompok percobaan yang terdiri dari 4 kelompok. Perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis dengan uji *Mann-whitney*. Perbedaan bermakna tidak didapatkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol dengan kelompok P1 ($p=0,25$), kelompok kontrol dengan kelompok P2 ($p=0,18$) dan kelompok kontrol dengan kelompok P3 ($p=0,13$).

Melihat hal tersebut maka dapat disimpulkan bahwa tidak didapatkan adanya perbedaan yang bermakna pada produksi NO makrofag pada mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* dengan mencit Balb/c yang mendapat ekstrak bawang putih dan kemudian diinfeksi *S. typhimurium* sehingga hipotesis tidak terbukti.

V.D. HASIL UJI KESINTASAN (*SURVIVAL ANALYSIS*)

Hasil analisis survival pada kelompok kontrol dan perlakuan ditampilkan pada tabel 5.

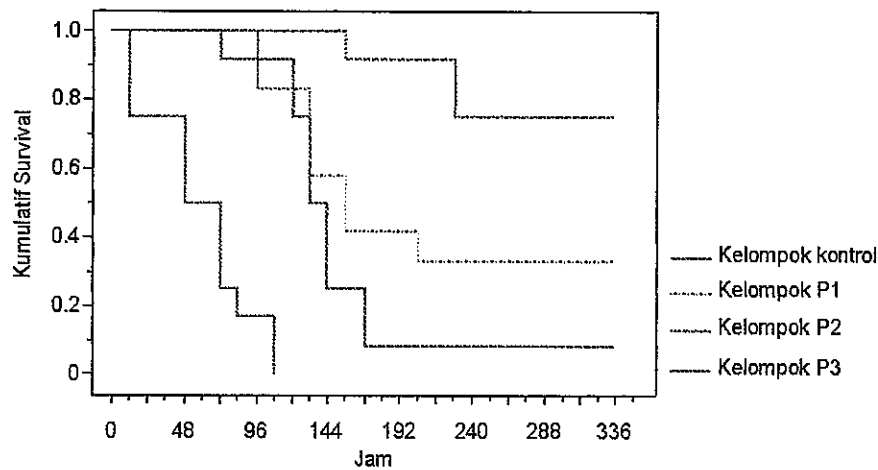
Tabel 5. Analisis survival

Kontrol	61	72	72	
Perlakuan 1	204	156	156	
Perlakuan 2	303	336	336	
Perlakuan 3	158	132	132	< 0,001

* Uji Log-Rank kelompok perlakuan vs kontrol

Data dari tabel 5 menunjukkan bahwa *median survival time* yang terpendek adalah pada kelompok kontrol dengan 50% *survival time* adalah 72 jam, sedangkan yang terlama adalah pada kelompok P2 yaitu *median survival time* 336 jam dengan 50% survival adalah 336 jam.

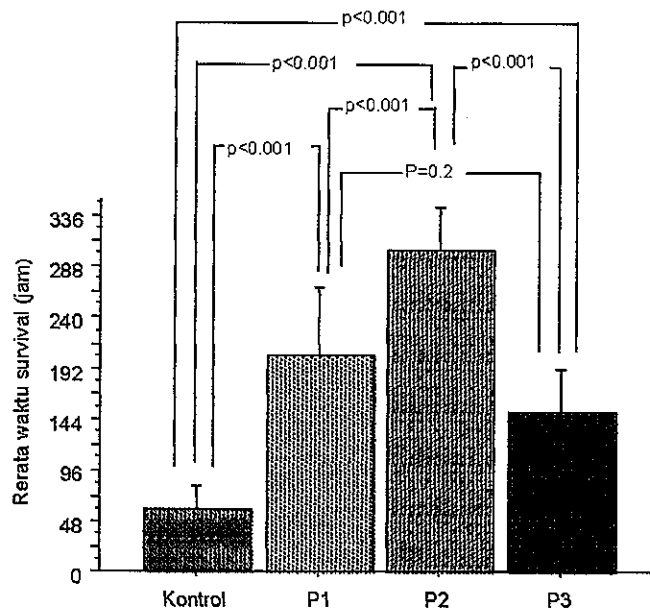
Diagram survival Kaplan Meier ditampilkan pada gambar 6.



Gambar 6. Diagram survival Kaplan-Meier

Data pada diagram survival menunjukkan kelompok dengan survival terbesar adalah kelompok P2 (dosis 2 mg/hari) diikuti dengan kelompok P1 (dosis 1 mg/hari) dan P3 (dosis 4 mg/hari). Kelompok dengan survival terendah adalah kelompok kontrol. Secara umum dapat diketahui dosis 2 mg/hari merupakan dosis optimal, pemberian bawang putih dengan dosis lebih tinggi (4 mg/hari) tidak memberikan peningkatan survival. Sedangkan dosis lebih rendah (1 mg/hari) akan memberikan survival yang lebih rendah dibanding dosis 2 mg/hari.

Rerata waktu survival pada kelompok kontrol, P1, P2 dan P3 ditampilkan pada gambar 7.



Gambar 7. Diagram batang rerata waktu survival kelompok kontrol (n=12), P1 (n=12), P2 (n=12) dan P3 (n=12). Error bar menunjukkan 95% interval kepercayaan.

Hasil uji statistik juga menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara waktu survival kelompok kontrol dengan kelompok P1 ($p < 0,001$), kelompok kontrol dengan kelompok P2 ($p < 0,001$) dan kontrol dengan P3 ($p < 0,001$). Perbedaan yang bermakna pada waktu survival juga dijumpai antara kelompok P1 dengan P2 ($p < 0,001$) dan kelompok P2 dengan P3 ($p < 0,001$). Sedangkan antara kelompok P1 dan P3 tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna ($p = 0,2$).

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini alur pembahasan disesuaikan dengan alur hasil penelitian dan hipotesis yang dibuktikan. Dengan demikian pengaruh pemberian ekstrak bawang putih terhadap aktivitas makrofag pada mencit Balb/C adalah sebagai berikut:

1. Hitung koloni kuman hepar dan lien

Dari hasil penelitian didapat bahwa jumlah rata-rata koloni kuman pada kelompok mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih rendah daripada kelompok kontrol, baik pada hepar maupun lien. Dengan demikian terbukti bahwa ekstrak bawang putih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian ini didukung oleh peneliti sebelumnya, Sharma, dkk yang mengatakan bahwa cairan bawang putih mampu berperan sebagai antibiotik sebanding dengan kloramfenikol.⁵¹

Penurunan jumlah koloni kuman dalam hal ini disebabkan oleh pengaruh *alliin* pada ekstrak bawang putih yang mampu meningkatkan fungsi imunitas seluler (imunomodulator) yaitu dengan meningkatkan pembentukan limfosit T, IL-1, TNF α , proliferasi sel Mono Nuklear serta peningkatan kemampuan diapedesis dari leukosit.⁵⁰ Penelitian lain dari Rini P., dkk membuktikan bahwa ekstrak bawang putih dapat meningkatkan respon imun primer awal pada mencit yaitu sebagai aktivator makrofag.⁵ Makrofag yang teraktivasi sangat berperan

penting dalam membunuh bakteri yang sedang tumbuh pesat di hepar dan lien pada fase ketiga infeksi *Salmonella* yaitu pada hari ketiga infeksi.⁵³

Makrofag yang teraktifasi menghasilkan sitokin yang berpengaruh pada proses *killing* bakteri. Sitokin-sitokin tersebut antara lain TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-12 dan IL-18. IL-1 yang dihasilkan makrofag akan mengaktifasi limfosit T untuk memproduksi sitokin yaitu IFN- γ yang memperantarai pembersihan kuman di hepar dan lien.^{19,50} IFN γ dapat diproduksi oleh sel CD $_4^+$, sel CD $_8^+$ dan sel NK. Pada fase awal infeksi *Salmonella*, IFN- γ diproduksi oleh sel NK.⁵⁰

IL-12 bersama IL-18 bekerja sinergis untuk menginduksi IFN- γ dari limfosit T. IFN- γ dan TNF- α memegang peranan penting terhadap infeksi *Salmonella* yaitu dengan meningkatkan aktifitas bakterisidal makrofag melawan bakteri ini.^{19,28,50}

Pengaruh bawang putih untuk meningkatkan kemampuan diapedesis leukosit dapat dilihat dari sel netrofil sebagai sistem imun alami infeksi bakteri juga berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Netrofil sangat penting sebagai bahan pertahanan efektif untuk melawan bakteri setelah 24 jam infeksi *Salmonella*, sehingga respon imun seluler utama pada infeksi bakteri intraseluler adalah fagositosis oleh makrofag atau sel PMN dan limfosit T.⁵⁰

Uji *Mann-whitney* menunjukkan adanya penurunan jumlah koloni kuman yang bermakna pada pemberian ekstrak bawang putih 2 mg/hari di hepar dan 1 mg/hari di lien. Diduga pemberian ekstrak bawang putih pada dosis 2 mg/hari lebih efektif di hepar dan pada dosis 1 mg/hari di lien melalui penurunan jumlah koloni kuman dibanding dosis-dosis perlakuan lain.

Hasil analisis juga menunjukkan bahwa pemberian dosis ekstrak bawang putih melebihi dosis efektif ternyata juga mampu menurunkan jumlah koloni kuman hepar maupun lien namun perbedaannya tidak signifikan. Hal ini diduga karena bawang putih juga memiliki kelemahan dalam membunuh bakteri jika digunakan secara berlebihan, seperti laporan Marcovici, dkk yang dikutip Fulder S, dkk bahwa diatas dosis standar, ekstrak bawang putih tidak mampu membunuh bakteri namun masih mampu menghambat perkembangbiakannya.⁵¹

2. Jumlah Ikatan Limfosit T - Makrofag

Dari hasil penelitian didapatkan jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag pada kelompok perlakuan lebih besar secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh efek imunomodulasi dari bawang putih dalam peningkatan sistem imun tubuh. Colic, dkk memperlihatkan efek *garlic aqueous extract* (GAE) dan *garlic ethanolic extract* (GEE) terhadap proliferasi limfosit T yang distimulasi dengan concanavalin A (Con A) secara in vitro. GAE dan GEE terbukti memodulasi proliferasi limfosit T.³⁶ Proliferasi limfosit ini berkaitan dengan ekspresi reseptor IL-2 dan produksi IL-2, yaitu sitokin yang menstimulasi proliferasi limfosit.^{53,54} Di samping itu, menurut Lau, dkk komponen-komponen bawang putih dapat meningkatkan fungsi makrofag dan limfosit T.⁵⁵

Respon imun yang pertama kali bekerja apabila *Salmonella* masuk ke tubuh inang adalah respon imun alami. Pada fase awal ini yang sangat berperan adalah sel-sel fagosit salah satunya adalah makrofag. Kyo, dkk mengemukakan

bahwa ekstrak bawang putih dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag peritoneal.⁵⁶ Pada fase selanjutnya, antigen *Salmonella* akan mengaktifkan respon imun spesifik. Bakteri yang difagositosis makrofag akan dipecah menjadi fragmen peptida yang kemudian akan diproses bersama MHC kelas II dan disajikan ke permukaan sel makrofag. Antigen ini akan dikenali oleh limfosit T, yaitu sel CD_4^+ sehingga akan terjadi ikatan sel CD_4^+ dengan makrofag. Sel CD_4^+ yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi Th_1 .⁴

Th_1 kemudian menghasilkan $IFN-\gamma$ yang akan mengaktifkan makrofag untuk membunuh bakteri yang terfagositosis.⁴ Sel Th_1 dan sel CD_4^+ juga akan mengeluarkan IL-2 yang berefek autokrin terhadap pertumbuhan dan proliferasinya sendiri serta proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T CD_8^+ .⁵ Makrofag yang teraktivasi oleh antigen akan mengeluarkan sitokin berupa IL-12 dan IL-18 yang bersama-sama menginduksi pembentukan $IFN-\gamma$ oleh sel Th_1 dan sel NK. $IFN-\gamma$ pada akhirnya akan mengaktifkan makrofag untuk membunuh bakteri yang terfagositosis.²⁸ IL-12 yang dihasilkan makrofag tersebut mempunyai peranan penting dalam respon imun Th_1 .¹⁴

Salmonella typhi mempunyai mekanisme untuk bertahan hidup di dalam makrofag yaitu dengan cara keluar dari fagosom makrofag dan masuk ke dalam sitoplasma makrofag. *Salmonella* mampu memodifikasi LPS dan merubah sintesis dari protein membran luar sehingga merubah sinyal terhadap respon imun sel *host*. Ketika *Salmonella* keluar dari fagosom makrofag dan masuk ke sitoplasma makrofag, maka sel CD_8^+ yang akan bekerja. Di dalam sitoplasma makrofag, antigen akan diproses bersama MHC I yang kemudian akan disajikan ke

permukaan sel makrofag. Antigen bersama MHC I ini akan dikenali oleh sel CD_8^+ . Sel CD_8^+ yang disebut akan berikatan dengan makrofag lewat antigen dan melisiskan makrofag yang terinfeksi tersebut. Sel CD_8^+ yang teraktivasi juga akan mengeluarkan $IFN-\gamma$ yang akan mengaktifkan *killing* makrofag.⁴ Menurut Morioka N, dkk fraksi protein yang terdapat dalam ekstrak bawang putih dapat meningkatkan sitotoksitas dari limfosit manusia.⁵⁷

Pengaruh bawang putih terhadap respon imun seluler berupa imunomodulasi, yaitu berupa peningkatan fungsi fagositosis makrofag, peningkatan proliferasi limfosit yang berkaitan dengan ekspresi reseptor IL-2 dan produksi IL-2, serta peningkatan sitotoksitas limfosit. Hal itu menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas dari komponen-komponen respon imun seluler. Dapat disimpulkan terjadi peningkatan proses imun seluler, yang salah satu parameternya adalah peningkatan ikatan limfosit T dengan makrofag.

3. Kadar NO makrofag peritoneal

Dari perlakuan yang diberikan, terlihat bahwa produksi NO makrofag kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh bawang putih yang tidak hanya berperan sebagai imunomodulator tetapi juga berperan sebagai anti inflamasi dalam mengatasi keadaan radang akibat syok septik pada demam tifoid sehingga homeostasis tubuh tetap terjaga.⁵⁸

Pada infeksi *S. typhimurium*, makrofag berperan aktif pada fase ketiga infeksi, yaitu pada saat pertumbuhan mikroorganisme yang pesat di limpa dan hati

mencapai fase tetap. Hal ini disebabkan oleh pengaruh makrofag yang teraktivasi dan memproduksi sitokin proinflamasi yaitu IL-12. IL-12 akan menstimulasi sel NK dan sel T helper untuk memproduksi IFN- γ yang akan beraksi pada makrofag untuk meningkatkan ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). iNOS adalah enzim yang berperan sebagai katalisa reaksi oksidasi salah satu nitrogen guonidino dari ariginin untuk menghasilkan NO dengan hasil samping citrullin.

Bawang putih juga mengandung *L-arginin* (prekursor NO) selain *alliin*. Bawang putih mengandung *L-arginin* dalam jumlah yang banyak sehingga diharapkan dapat menstimulasi pembentukan NO yang lebih banyak. Tetapi menurut I. Das, dkk *L-arginin* ternyata bukan merupakan komponen bawang putih yang bertanggungjawab atas aktivasi iNOS. Sehingga banyaknya kandungan *L-arginin* pada bawang putih belum tentu dapat menyebabkan aktivasi iNOS sehingga NO terbentuk.⁵⁹

NO yang dihasilkan dapat dioksidasi menjadi senyawa *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNIs) yang kemudian dapat merubah senyawa-senyawa amin menjadi bentuk *N-nitroso compounds* (NOC) yang bersifat toksik terhadap bakteri dan juga sel yang memproduksinya (dalam hal ini makrofag) serta sel-sel di sekitarnya.⁵⁸

Dalam tahap ini bawang putih selain berperan sebagai imunomodulator juga mempunyai efek anti inflamasi sehingga akan mengurangi produksi NO dengan akibat kerusakan terhadap sel yang sehat akan berkurang. Ekstrak bawang putih dan salah satu komponen bawang putih *S-allyl cysteine* (SAC) menghambat

produksi NO pada makrofag peritoneal yang teraktivasi melalui supresi terhadap iNOS mRNA dan ekspresi protein oleh LPS and IFN- γ .^{58,60}

Menurut Schwartz, dkk bawang putih dapat bersifat immunosupresan terhadap produksi NO untuk menghindari adanya stres jaringan. Peran bawang putih di sini adalah sebagai antioksidan yang mempunyai mekanisme inhibisi iNOS dan CAT-2 (*cationic amino acid transporter-2*) sehingga produksi NO tidak bisa berlangsung untuk menghindari kerusakan miosit jantung.³⁷

Selain konsentrasi NO yang rendah pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol, pada uji statistik didapatkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok dalam jumlah kadar NO makrofag yang diproduksi.

Hal ini memperlihatkan bahwa variasi dosis yang ada dapat dianggap potensinya tidak jauh berbeda dalam mempengaruhi produksi NO. Walaupun begitu didapatkan kadar NO yang lebih tinggi pada kelompok P2 dengan dosis ekstrak bawang putih 2 mg per hari dibandingkan kelompok perlakuan lain. Diduga dosis 2 mg/hari lebih meningkatkan produksi NO makrofag dibandingkan dengan dosis 1 mg/hari maupun 4 mg/hari.

4. Survival rate

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa *median survival time* yang terendah adalah pada kelompok kontrol dengan 50% *survival time* adalah 72 jam, sedangkan yang terpanjang adalah pada kelompok P2 yaitu *median survival time* 336 jam dengan 50% survival adalah 336 jam.

Hasil uji statistik juga menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara waktu survival kelompok kontrol dengan kelompok P1 ($p<0,001$), kelompok kontrol dengan kelompok P2 ($p<0,001$) dan kontrol dengan P3 ($p<0,001$). Perbedaan yang bermakna pada waktu survival juga dijumpai antara kelompok P1 dengan P2 ($p<0,001$) dan kelompok P2 dengan P3 ($p<0,001$). Sedangkan antara kelompok P1 dan P3 tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna ($p=0,2$).

Dengan demikian membuktikan pemberian ekstrak bawang putih memperpanjang waktu survival mencit yang diinfeksi *S. typhimurium* sejalan dengan penelitian respon imun yang telah diteliti berupa hitung kuman organ hepar dan lien kelompok yang diberi ekstrak bawang putih lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok kontrol, jumlah ikatan limfosit terhadap makrofag kelompok yang diberi ekstrak bawang putih lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol, namun produksi NO makrofag kelompok yang diberi ekstrak bawang putih ternyata lebih rendah walaupun tidak bermakna dibanding kelompok kontrol.

Secara fisiologik dapat diperhatikan salah satu efek NO terhadap hemodinamik berupa fungsi pengatur tonus vaskuler, *hepato-splanchnic blood flow*, efek terhadap fungsi otot jantung, terhadap fungsi trombosit dan aliran darah renal.^{61, 62}

Fungsi NO sebagai pengatur tonus vaskuler adalah untuk mempertahankan homeostasis vaskuler untuk mencegah timbulnya syok septik yang sering disebabkan adanya infeksi atau endotoxin.^{61, 62, 63} *Hepato-splanchnic blood flow*

terpengaruh oleh NO yang menyebabkan kuman akan banyak pada organ hepar dan lien seperti tampak pada hasil cfu hepar dan lien.^{61, 62} Dengan demikian melihat efek NO yang disebut sebagai *ambiquitous biological molecule*⁶⁴ maka pada penelitian ini tidak mendukung mekanisme killing melalui peningkatan produksi NO.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

VII. A. KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pengaruh ekstrak bawang putih dengan dosis 2 mg per hari terbukti menurunkan jumlah koloni kuman hepar ($p=0,03$), dan dosis 1 mg per hari terbukti menurunkan jumlah koloni kuman lien ($p=0,05$).
2. Pengaruh ekstrak bawang putih dengan berbagai dosis terbukti meningkatkan jumlah ikatan limfosit T dengan makrofag ($p=0,01$).
3. Pengaruh ekstrak bawang putih dengan berbagai dosis tidak terbukti meningkatkan produksi NO makrofag ($p=0,37$).
4. Pengaruh ekstrak bawang putih dengan berbagai dosis terbukti meningkatkan *Survival rate* ($p<0,001$).

VII.B. SARAN

Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian ini masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian tersebut akan menjadi landasan untuk kemungkinan dilakukan pengujian pada manusia mengingat semakin banyak produk-produk ekstrak bawang putih yang dipasarkan.

Beberapa penelitian lanjutan yang diperlukan untuk melengkapi konsep pemikiran tersebut antara lain:

- Disain penelitian yang sama diterapkan pada kuman berbeda misalnya *L. monocytogenes*.
- Desain metodologi penelitian yang divariasi baik waktu penginfeksian maupun pengamatan secara serial
- Pemeriksaan histopatologi hepar dan lien serta pemeriksaan ROI
- Pemeriksaan produksi sitokin makrofag peritoneal, sel Kuppfer maupun limfosit lien
- Penelitian pada manusia dengan pemberian ekstrak bawang putih dosis 600mg/hr sebagai terapi pendamping dengan memperhatikan efek sampingnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M. *Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge*. Trends Microbiol 1995; 3: 253-5.
2. Khan SA, Everest P, Servos S, et. al.. *A lethal role for lipid-A in Salmonella infections*. Mol Microbiol 1998; 29(2):571-9
3. Hadisaputro S. *Managemen Penyakit Infeksi : Perkembangan baru Antibiotika dan Imunostimulan*. Prociding Simposium Mini Manajemen Infeksi. Semarang, 2001.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Mollecular Immunology 3th Ed*, Philadelphia:WB Saunders co, 1997:342-9.
5. Rini P, Mohamad S, Jeremiah TR. *Pemberian ekstrak bawang putih (allium sativum linn) secara intraperitonel dan peningkatan respon imun primer awal pada tikus putih*. Majalah Kedokteran Indonesia 1997; Volume 47
6. Sudarsono, *Tumbuhan Obat, Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan*, Pusat Penelitian Obat Tradisional UGM. Yogyakarta 1996
7. Shyh-ming T, Mei-chin Y. *In vitro activity of garlic oil and four diallilsulphides against antibiotic-resistant pseudomonas aeruginosa and klebsiella pneumoniae*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001; 47:665-70
8. Male D, *Immunology*. 2nd Ed. London: Gower Medical Publication, 1993: 49-54
9. Roitt I, Brostoff J, Male D, *Immunology*, London-New York Gower Medical Publishing. 1998
10. Goodman JW. *The Immune Response*. In: Stites DP, Terr AI (Eds). *Basic and Clinical Immunology*, 8th Ed. Connecticut: Prentice Hall Int. Inc. 1994: 40-9
11. Hennesey LR, Baker JR., In: Stites DP, Terr AI (Eds). *Immunomodulator in Basic and Clinical Immunology*, 8th ed. Connecticut: Appleton and Lange, 1994:781-85
12. Chapes SK; Beharka AA., *Salmonella infections in the absence of the major histocompatibility complex II.*, J Leukoc Biol 1998; 63(3):297-304
13. Ziegler K, Unanue ER. *Identification of macrophage antigen processing event required for Ia region restricted antigen presentation to T Lymphocytes*. J Immunol 1998; 127:1865-75,

14. Huang LY, Kreig AM, Eller N, et. al. *Induction and regulation of Th₁-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide and heat-inactivated bacteria*, Infection and immunity 1999:6257-63
15. Suter E, dalam Hsu HS. *Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis*, Microbiological review, 1989, p. 390-409
16. H.S. Hsu, *Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis*, Microbiological review, 1989, p. 390-409
17. Subowo. *Imunobiologi*, Bandung: Angkasa, 1993: 35-48, 53-73, 151-64, 187-215.
18. Jones B, Falkow S, *Salmonellosis: Host immune responses and bacterial virulence*, Annu Immunol 14: 533-561, 1996
19. Cammie FL, Samuel IM. *Salmonellosis*, Harrison's Principles of Internal Medicine, 15/e, McGraw-Hill, 2001
20. Van der Bergh E, Gasem MH, Keuter M, Dolmans WMV. *Outcome in three groups of patient with typhoid fever treated in Indonesia between 1948 and 1990*, suplemen, 1999
21. Nitea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JWM. *Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis*, Eur J Clin Invest 1999; 29(4):351-6
22. Nitea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JWM. *Circulating cytokines as mediators of fever*. Clinical Infectious Disease. 2000; 31:S180
23. Mazzarella G, Petillo O, Margarucci S, Calabrese C, Peluso G. *Role of monocyte/macrophage population in immune response*. Monaldi Arch Chest Dis 1998; 23:92-6
24. Conlan JW & North RJ. *Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria Listeria monocytogenes, Francisella tularensis and Salmonella typhimurium involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes*. J Infect & Immun 1992: 5164-71
25. Jaap T, Van D; Stikkelbroeck JJM, Sluiter W, et.al. *Differences in initial rate of intracellular killing of Salmonella typhimurium by granulocyte of Salmonella susceptible C57BL/10 mice and Salmonella-resistant CBA mice*. The Journal of Immunology 1986; 136:1074-80
26. Jaap T, Van D, Stikkelbroeck JJM, Barselaar MTh, et.al. *Divergent changes in antimicrobial activity after immunologic activation of mouse peritoneal macrophages*, The Journal of Immunology 1987; 139:1665-72

27. Mastroeni P, Harrison JA, Robinson JH, *et.al.* *Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent salmonellae in Balb/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation.* *Infect Immun* 1998; 66(10):4767-76
28. Mastroeni P, Clare S, Khan S, *et.al.* *Interleukin-18 contribute to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium,* *Infection and Immunity.* 1999:478-83
29. Matsui K, Arai T, *Salmonella* infection-induced non-responsiveness of murine splenic T-lymphocytes to Interleukin-2 (IL-2) involves inhibition of IL-2 receptor gamma chain expression. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 20(3):175-80
30. Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Weerkamp AH, *et.al.* *Dietary calcium inhibits the intestinal colonization and translocation of Salmonella in rats.* *Gastroenterology*, 1997; 113(2):550-7
31. Anonim, *Tanaman Obat Indonesia*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 1985
32. Koncienly J, Klussendorf D, Latza R, *et.al.* *The antiatherosclerotic effect of Allium sativum.* *Atherosclerosis* 1999, 144(1):237-49
33. Harunobu A, Brenda LP, Hiromichi M, *et.al.* *Intake of garlic and its bioactive components.* *J. Nutr* 2000; 131: 955S-62S
34. Carmia B, *Antioxidant health effects of aged garlic extract.* *J. Nutr*, 2001; 131:1010S-15S
35. Marjorie MC, *Plant product as antimicrobial agents.* *Clinical Microbiology Review.* 1999: 64-582
36. Colic M, Vucevic D, Kilibarda V, *et.al.* *Modulary effects of garlic extracts on proliferation of T-lymphocyte in vitro stimulated with concanavalin A,* *Phytomedicine.* 2002; 9(2):117-24
37. Schwartz IF, Herschkovits R, Iaina A, *et.al.* *Galic attenuates Nitric Oxide production in rat cardiac myocytes through inhibition of inducible Nitric Oxide Synthase and the arginine transporter CAT-2 (Cationic Amino Acid Transporter-2).* *Clin Sci* 2002; 102(5):487-93
38. Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, *et.al.* *Effects of garlic extract (Allium sativum) on neutrophil migration the cellular level.* *Heart Dis* 2001; 3(1):14-7
39. Kyo E, Uda N, Ushijima M, *et.al.* *Prevention of phychological stress-induced immune suppression by aged garlic extract.* *Phytomedicine* 1999; 6(5):325-30

40. Umezawa K, Akaike T, Fujii S, *et.al.* Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun* 1997; 65(7):2932-40
41. Schwacha MG, Meissler JJ Jr, Eisenstein TK, *Salmonella typhimurium* infection in mice induces Nitric Oxide-mediated immunosuppression through a natural killer cell-dependent pathway. *Infect Immun* 1998; 66(12):5862-6
42. Huang D, Schwacha MG, Eisenstein TK, *Attenuated Salmonella vaccine-induced suppression of murine spleen cell responses to mitogen is mediated by macrophage nitric oxide: quantitative aspects.* *Infect Immun* 1996; 64(9):3786-92
43. Schwacha MG, Eisenstein TK, *Interleukin-12 is critical for induction of nitric oxide-mediated immunosuppression following vaccination of mice with attenuated Salmonella typhimurium.* *Infect Immun* 1997; 65(12):4897-903
44. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, *et.al.*, *Interleukin-18 (IFN- γ -inducing factor) induced IL-8 and IL-1 β via TNF- α producing from non-CD14⁺ human blood mononuclear cell.*, *J. Clin. Investig* 1998; 101:711-21
45. Hinder F, Stubbe HD, Van Aken H, *et.al.* *Role of Nitric Oxide in sepsis-associated pulmonary edem*, *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 159(1):252-7
46. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Diagnostic Microbiology*, 9th Ed. St. Louis: Mosby- Year book. Inc 1990:284-95.
47. Lipscomb MF, Ben Sasson SZ, Uhr JW. *Specific binding of T-lymphocytes to macrophages.* *J immunol* 1977; 118:1748
48. Ziegler K, Unanue ER. *The specific binding of Listeria monocytogenes immune T- lymphocytes to macrophage.* *J Exp Med* 1979; 150:1143-60
49. Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, *et. al.* *Production of reactive nitrogen intermediates by macrophages.* In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE eds. *Methods in Immunotoxicology*, Vol 2. New York -Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: A John Willey & Sons. Inc, 1995:99-117.
50. Kathi JK, Garlic (*Allium sativum*). URL:
http://www.sph_uth.tmc.edu/utcam/summary/garlic.htm
51. Fulder S, Blackwood J, Soetrisno E. *Buku pintar terapi bawang putih obat asli alami*, Jakarta: Inovasi 2002:1-30
52. Keuter M., *Experimental studies on patogenesis of salmonella infection.* Thesis. Katolieke Universiteit Nijmegen 1998:11-153

53. Colic M, Savic M, *Garlic extracts stimulate proliferation of rat lymphocytes in vitro by increasing IL-2 and IL-4 production*. Immunopharmacol Immunotoxicol 2000; 22(1):163-81
54. Granato H, *Immune Function*. Elsevier July 2003. URL: <http://www.naturalproductsinsider.com/articles/341feat.htm>
55. Lau BH, Yamasaki T, Griedley DS. *Garlic compounds modulate macrophage and T lymphocyte functions*. Mol Biother 1991; 3:2103-7
56. Kyolic Research. *Research found that aged garlic extract was effective at enhancing Natural Killer cell activity*. 2002 URL: <http://kyolicformula.nutrifit.com/>
57. Morioka N, Sze LL, Morton DL, *et.al A protein fraction from aged garlic extract enhances cytotoxicity and proliferation of human lymphocytes mediated by interleukin-2 and concanavalin A*. Cancer Immunol Immunother 1993; 37(5):316-22
58. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, *Cancer prevention compounds from garlic* 2002, Vol.3:305-311
59. Das I, Hirani J, Sooranna S, *Arginin is not responsible for the activation of Nitric Oxide synthase by garlic*. Journal of Ethnopharmacology 1996; 53(1):5-9
60. Ide N, Lau BH. *Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress*. Phytomedicine 1999; 6(2):125-31
61. Vincent JL, Zhang H, Szabo S, *et.al.Effect of Nitric Oxide in septic shock*, Am J Respi Crit Care Med 2000; Vol. 161:1781-5
62. Moncada S, Higgs A, *The L-arginin-Nitric Oxide pathway*, Mechanism of Disease, 1993; Vol. 329(27):2002-12
63. Ferric CF, *Mechanisms of Nitric Oxide-related antimicrobial activity*, J Clin Invest, 1997; Vol. 99(12):2818-25